



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή Μελέτη

Ανάπτυξη μιας τεχνικής “Whole Transcriptome Amplification” για την αλληλούχιση εντεροϊών

Λάρισα 2016

Νικολέτα Γιαρίμογλου

Ανάπτυξη μιας τεχνικής “Whole Transcriptome Amplification” για την
αλληλούχιση εντεροϊών

Development of a “Whole Transcriptome Amplification” assay, for
enteroviruses sequencing

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π.ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ) :

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ :

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ :

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Abstract

Human enteroviruses belong to the genus *enterovirus* of Picornaviridae family. The members of this family are non-enveloped viruses and their genome is a single-stranded RNA of positive polarity. Their genome consists of a highly conserved 5'UTR, an open reading frame and a 3'UTR with a poly(A) tract. There are about 100 different serotypes of enteroviruses that cause a range of clinical manifestations, from asymptomatic infections to aseptic meningitis, myocarditis and acute flaccid paralysis. The well-studied enterovirus is poliovirus, because of the emergence of poliomyelitis and the need for its eradication.

Enterovirus sequencing is particularly important for both epidemiological and diagnostic studies and for the discovery of novel viruses. Enteroviruses, as all RNA viruses, consist of a small genome with a high degree of variability due to the low fidelity of viral RNA polymerase that is used for enteroviral replication.

In the present thesis, it was developed an easy and low-cost assay, which is able to amplify the whole genome of enteroviruses in a few reactions. At first DOP-PCR was performed, for non-specific pre-amplification of the genome followed by separate PCRs for the specific amplification of the various regions. The full coverage of the genome of the samples that were used (recombinant Sabin strains), was achieved with mainly 4 amplification reactions and the largest PCR product consisted of 2392bp. Sequencing of the PCR products confirmed the reliability of the assay.

Περίληψη

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών της οικογένειας των Picornaviridae. Τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι μη ελυτροφόροι ιοί και το γένωμα τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας κι έχει μήκος περίπου 7500 νουκλεοτίδια. Το γένωμά τους αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'-αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, μία 3'-αμετάφραστη περιοχή με μία πολύ(A)-ουρά. Υπάρχουν περίπου 100 ορότυποι εντεροϊών που προκαλούν ένα φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, από ασυμπτωματικές λοιμώξεις μέχρι πιο σοβαρές ασθένειες, όπως ασηπτική μηνιγγίτιδα, μυοκαρδίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση. Ο καλύτερα μελετημένος εντεροϊός, είναι ο πολιοϊός, εξαιτίας της εμφάνισης της πολιομυελίτιδας και της ανάγκης για την εξάλειψή της.

Η αλληλούχιση των εντεροϊών είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για επιδημιολογικές όσο και για διαγνωστικές μελέτες καθώς και για μελέτες εύρεσης νέων ιών. Οι εντεροϊοί, καθώς και όλοι οι RNA ιοί, έχουν μικρά γονιδιώματα τα οποία έχουν υψηλό βαθμό ποικιλότητας, λόγω της χαμηλής πιστότητας της ιικής RNA πολυμεράσης που χρησιμοποιούν για την αντιγραφή τους, δημιουργώντας πολλά προβλήματα στην προσπάθεια ανάπτυξης τεχνικών για την αλληλούχισή τους.

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε μία τεχνική κατά την οποία καθίσταται δυνατή η ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος των εντεροϊών με λίγες μόνο αντιδράσεις. Αρχικά πραγματοποιείται DOP-PCR, για μη ειδική προ-ενίσχυση του γονιδιώματος και στη συνέχεια ξεχωριστές PCR για την ειδική ενίσχυση των διαφόρων περιοχών. Η κάλυψη ολόκληρου του γονιδιώματος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (ανασυνδυασμένα στελέχη Sabin) επιτεύχθηκε με μόνο 4 αντιδράσεις ενίσχυσης και το μεγαλύτερο κομμάτι που ενισχύθηκε αποτελούνταν από 2319bp. Η αλληλούχιση του κάθε προϊόντος PCR επιβεβαίωσε την αξιοπιστία της τεχνικής.

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή	σελ.1
1.1 Βιολογία των Εντεροϊών	σελ.1
1.2 Ταξινόμηση των Εντεροϊών	σελ.1
1.3 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων	σελ.4
1.4 Οργάνωση και δομή του ιικού γονιδιώματος	σελ.7
1.4.1 Η 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR)	σελ.7
1.4.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)	σελ.9
1.4.3 Η 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR)	σελ.10
2. Κύκλος Ζωής των Εντεροϊών	σελ.11
2.1 Προσκόλληση	σελ.13
2.1.1 Κυτταρικοί υποδοχείς και συνυποδοχείς	σελ.13
2.1.2 Δημιουργία πόρου στην κυτταρική μεμβράνη	σελ.14
2.2 Μετάφραση του ιικού RNA	σελ.16
2.3 Επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης	σελ.17
2.4 Αντιγραφή του ιικού RNA	σελ.19
2.5 Καψιδίωση- Σχηματισμός νέων ιικών σωματιδίων	σελ.21
3. Παθογένεια	σελ.23
4. Εξέλιξη	σελ.24
4.1 Μεταλλάξεις	σελ.24
4.2 Ανασυνδυασμός	σελ.26
4.2.1 Αντιγραφικός Μηχανισμός	σελ.27
4.2.2 Μηχανισμός Ρήξης και Επανένωσης	σελ.29
Στόχος της Εργασίας	σελ.30
Υλικά και Μέθοδοι	σελ.31
1. Στελέχη Εντεροϊών	σελ.31
2.Υπολογισμός του TCID ₅₀ των κλινικών δειγμάτων	σελ.31
3. Εκχύλιση του ιικού RNA	σελ.33
4. Αντίστροφη Μεταγραφή	σελ.34

5. DOP (Degenerate oligonucleotide primed)-PCR	σελ.35
6.Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	σελ.38
7. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR	σελ.41
8. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	σελ.42
9.Αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων	σελ.42
10.BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	σελ.42
11. Real- Time PCR	σελ.43
Αποτελέσματα	σελ.45
1. Αποτελέσματα PCR	σελ.45
2. Αποτελέσματα Αλληλούχισης- BLAST	σελ.49
3. Αποτελέσματα Real- Time PCR	σελ.50
Συζήτηση	σελ.52
Βιβλιογραφία	σελ.58

1.Εισαγωγή

1.1 Βιολογία των εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια ιών Picornaviridae. Οι Picorna ιοί συγκροτούν μία από τις μεγαλύτερες και περισσότερο ενεργές οικογένειες ιών υπό μελέτη [Lauber and Gorbalenya, (2012)]. Τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι μη ελυτροφόροι ιοί και το γένωμα τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας κι έχει μήκος περίπου 7500 νουκλεοτίδια. Η οικογένεια αυτή των ιών περιλαμβάνει κι άλλους παθογόνους ιούς των ανθρώπων και των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των πολιοϊών, του ιού της Ηπατίτιδας Α, των ρινοϊών και του FMDV (foot and mouth disease virus). Υπάρχουν περίπου 100 ορότυποι εντεροϊών που προκαλούν ένα φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, από ασυμπτωματικές λοιμώξεις μέχρι πιο σοβαρές ασθένειες, όπως άσηπτη μηνιγγίτιδα, μυοκαρδίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση [Pallansch *et al.*, (2007), Khetsuriani *et al.*, (2006)]. Το όνομα αυτής της οικογένειας ιών, αναφέρεται στο μικρό μέγεθος των ιών (pico, μια μικρή μονάδα μέτρησης [10⁻¹²]) και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που απαρτίζει το ιικό γονιδίωμα (RNA).

1.2 Ταξινόμηση εντεροϊών

Η οικογένεια Picornaviridae ανήκει στην τάξη Picornavirales. Η τάξη αυτή αποτελείται από τις οικογένειες *Picornaviridae*, *Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae* και *Secoviridae* και από 2 μη καταχωρημένα σε οικογένειες γένη *Bacillarnavirus* και *Labrynavirus* [Le Gall *et al.*, (2008), Sanfacon *et al.*, (2011)].

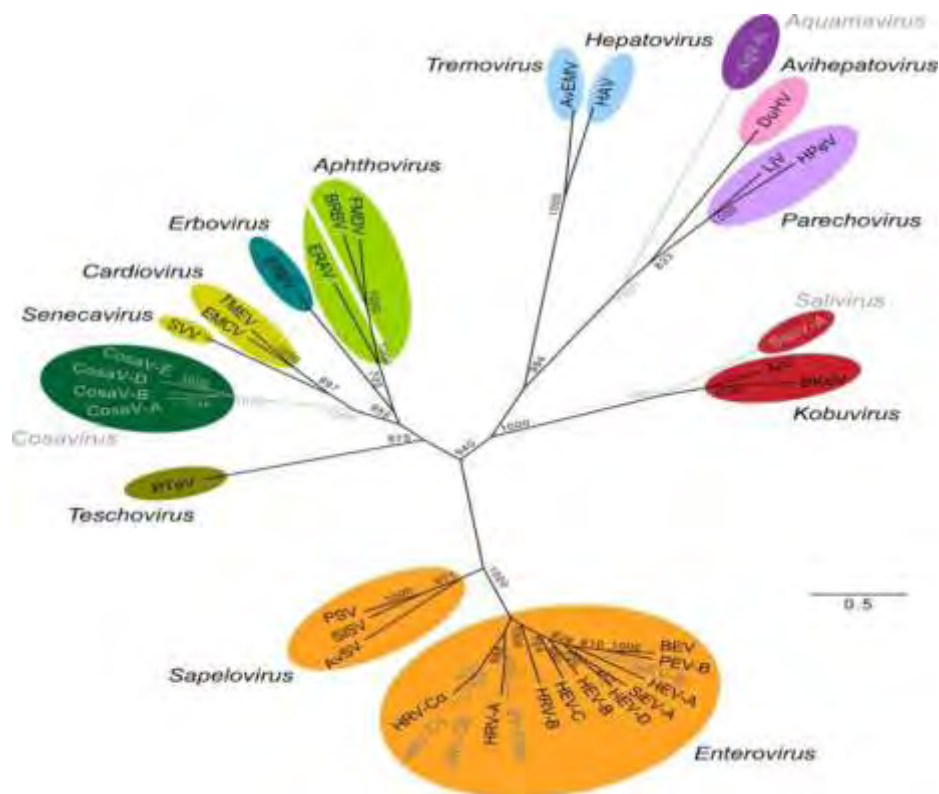
Η οικογένεια των ιών Picorna αποτελείται από είκοσι εννιά γένη:

<i>Aphthovirus</i>	<i>Aquamavirus</i>	<i>Avihepatovirus</i>	<i>Avisivirus</i>
<i>Cardiovirus</i>	<i>Cosavirus</i>	<i>Dicpivirus</i>	<i>Enterovirus</i>
<i>Erbovirus</i> ,	<i>Gallivirus</i>	<i>Hepatovirus</i>	<i>Hunnivirus</i>
<i>Kobuvirus</i> ,	<i>Kunsagivirus</i>	<i>Megrivirus</i>	<i>Mischivirus</i>

<i>Mosavirus</i>	<i>Oscivirus,</i>	<i>Parechovirus</i>	<i>Pasivirus</i>
<i>Passerivirus</i>	<i>Rosavirus,</i>	<u><i>Sakobuvirus</i></u>	<i>Salivirus</i>
<i>Sapelovirus</i>	<i>Senecavirus</i>	<i>Sicinivirus</i>	<i>Teschovirus</i>
<i>Tremovirus</i>			

Πίνακας 1.2.1: Συγκεντρωτικός πίνακας των 29 γενών της οικογένειας *Picornaveridae*

Και δύο προτεινόμενα νέα γένη "*Limnipivirus*" και "*Potamipivirus*", σύμφωνα με τη νέα, εγκεκριμένη από τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV), ταξινόμηση το Φεβρουάριο του 2015 [Knowles *et al.*,(2012); Adams *et al.*,(2015)].



Εικόνα 1.2.1:Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο απεικονίζονται οι εξελικτικές σχέσεις και αποστάσεις μεταξύ των γενών της οικογένειας *Picornaviridae* [Lauber and Gorbalenya, 2012]

Κάθε γένος αποτελείται από αντιγονικά διακριτά στελέχη, τα οποία διαχωρίζονται βάσει των ομοιοτήτων των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του ιοσωματίου, της γενωμικής αλληλουχίας και της οργάνωσης του γονιδιώματος.

Αρχικά το γένος των εντεροϊών αποτελούνταν από μέλη που ανήκουν στις ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες: τους *Πολιοϊούς* (PV, ορότυποι 1-3), τους *Coxsackie*

A ιούς (CAV, ορότυποι 1-24), τους *Coxsackie B* ιούς (CBV, ορότυποι 1-6) και τους *Echo* ιούς (E, ορότυποι 1-33) (Knipe and Howley, 2007). Με την εξέλιξη του ταξινομικού συστήματος οι εντεροϊοί χωρίστηκαν σε 12 διακριτά είδη, με διάφορους οροτύπους ο καθένας. (Πίνακας 1.1.1)

Γένος Εντεροϊών	Αριθμός Οροτύπων
<i>Enterovirus A</i>	25
<i>Enterovirus B</i>	61
<i>Enterovirus C</i>	23
<i>Enterovirus D</i>	5
<i>Enterovirus E</i>	4
<i>Enterovirus F</i>	6
<i>Enterovirus G</i>	11
<i>Enterovirus H</i>	1
<i>Enterovirus J</i>	6
<i>Rhinovirus A</i>	80
<i>Rhinovirus B</i>	32
<i>Rhinovirus C</i>	54

Πίνακας 1.2.2.: Νέα ταξινόμηση των εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποί τους

Το γένος των εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό ως προς τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη του στον άνθρωπο και απαρτίζεται από τους πολιοϊούς (3 ορότυποι), τους ιούς *Coxsackie A* (23 ορότυποι) και *B* (6 ορότυποι), τους *Echo* ιούς (28 ορότυποι), αλλά και άλλους εντεροϊούς που δεν έχουν ταξινομηθεί σε αυτές τις κατηγορίες, αλλά έχουν αριθμηθεί με βάση τη σειρά αναγνώρισής τους (εντεροϊοί 68-71). Οι εντεροϊοί πολλαπλασιάζονται στον πεπτικό σωλήνα, και είναι ανθεκτικοί στο χαμηλό pH.

Οι ιοί *picorna* είναι από τους πιο απλούς RNA ιούς, έχοντας ένα ισχυρά δομημένο καψίδιο. Άσχετα από το μικρό και περιορισμένο τους μέγεθος, η εξέλιξη στους ιούς *picorna* οδηγεί στη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού εύκολα διακριτών μελών, των επονομαζόμενων αντιγονικών οροτύπων.

Κάθε ορότυπος συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, αλλά και τη χρήση των υποδοχέων. Ο ορότυπος προσδιορίζεται από τις συνδετικές θηλιές και τα C- τελικά άκρα των καψιδιακών πρωτεϊνών που περιβάλλουν την εξωτερική επιφάνεια του ιοσωμάτιου. Αυτά περιλαμβάνουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού. Μεταλλάξεις σε αυτές

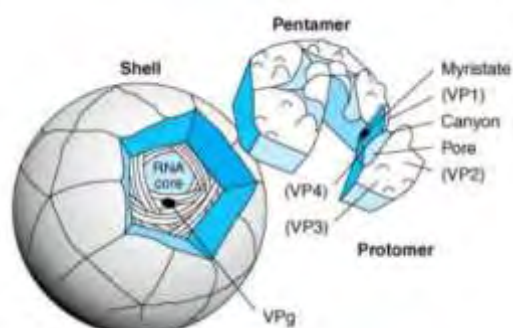
τις θέσεις μπορούν να προσδώσουν «ανθεκτικότητα» έναντι μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Οι συσχετισμοί αυτοί με βάση τις ασθένειες, παρ' όλα αυτά, έχουν μόνο μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, ιούς Coxsackie A ή B και ιούς echo, η οποία έγινε βασισμένη στην βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή παράλυση (πολιοϊοί) - χαλαρή παράλυση σε νεογνά ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και στοματικές φλύκταινες (ιοί Coxsackie A) – σπαστική παράλυση σε νεογνά ποντίκια και ανθρώπινη καρδιακή νόσος και νόσος του ΚΝΣ (ιοί Coxsackie B). Ανάμεσα στις ομάδες αυτές, οι ιοί μπορούν να ξεχωρίσουν βάσει της αντιγονικότητας τους όπως αυτή προσδιορίζεται με την βοήθεια αντι-ορών.

Αυτές οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις, που προσδιορίζουν τον ορότυπο, έγιναν περισσότερο πολύπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Η διάκριση μεταξύ οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται καθώς ανακαλύπτονταν ιοί που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς ορότυπους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, ο ορότυπος παραμένει μια ιδιότητα που διαχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς [Flanegan *et al.*, (1977)].

1.3 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων

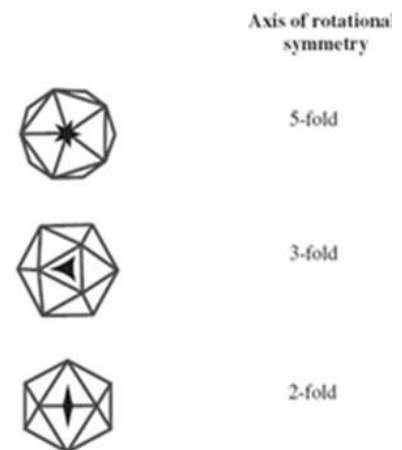
Ύστερα από μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, βρέθηκε ότι τα ιωσώματα των εντεροϊών είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Τα σωματίδια είναι απλά και αποτελούνται από πρωτεϊνικό περίβλημα που περιβάλλει το γυμνό



Εικόνα 1.3.1: Δομή ενός τυπικού Picorna Ιού. Απεικονίζεται η εσωτερική τοποθέτηση του RNA που περιβάλλεται από το πενταμερές των πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4. [Rueckert (1996)]

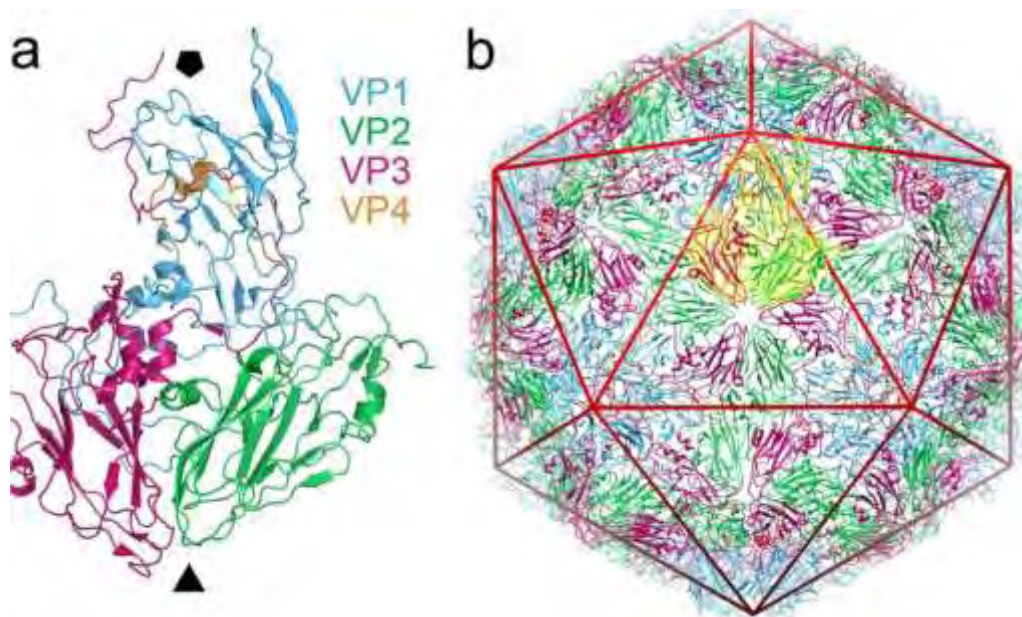
RNA. Τα ιωσώματα δεν διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο και η μολυσματικότητά τους είναι μικρή σε οργανικούς διαλύτες [Melnick *et al.* (1996)]. Οι εντεροϊοί είναι σταθεροί σε όξινο περιβάλλον και διατηρούν τη μολυσματικότητά τους σε τιμές pH 3 και μικρότερες.

Τα καψίδια των εντεροϊών σχηματίζονται από 60 αντίγραφα τεσσάρων πρωτεϊνών: VP1, VP2, VP3 και VP4. Σύμφωνα με μελέτες των Caspar και Klug πάνω στις αρχές δόμησης των ιών [Caspar , Klug (1962)], ο καλύτερος τρόπος για να συναρμολογηθεί ένα κέλυφος με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι να διαταχθούν οι πρωτεΐνες με εικοσαεδρική συμμετρία. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι 60. Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας, ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Τα αποτελέσματα μελετών περίθλασης ακτίνων Χ, ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών στα ιοσωμάτια και τα προϊόντα διαχωρισμού τους οδήγησε στην υπόθεση ότι τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή [Rueckert *et al.*, (1969)]. Η αντίληψή μας για την δομή των πολιοϊών έκανε ένα μεγάλο άλμα το 1985 όταν οι ατομικές δομές του πολιοϊού τύπου 1 καθορίστηκαν μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ [Hogle *et al.*, (1985)].



Εικόνα 1.3.2: Οι 3 άξονες συμμετρίας σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο

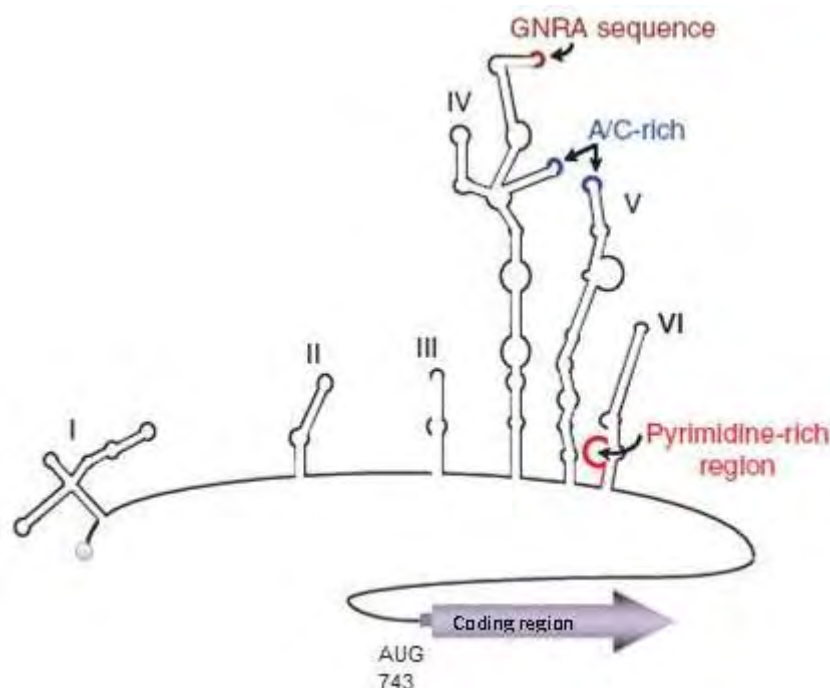
Ο βασικός λίθος του καψιδίου των εντεροϊών είναι το πρωτομερές (P1), το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Η βασική μονάδα του εικοσαεδρικού καψιδίου είναι ένα πενταμερές το οποίο συνίσταται από πέντε αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης VP0, στην οποία συνδέονται ομοιοπολικά οι VP2 και VP4. Κατά τη συγκρότηση του καψιδίου, δώδεκα τέτοια πενταμερή ενώνονται ώστε να σχηματιστεί το προκαψίδιο. Διάσπαση της VP0 στις VP4 και VP2 αποτελεί το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του γενετικού υλικού στο καψίδιο και της σταθεροποίησης του ώριμου πλέον ιού. Οι VP1, VP2 και VP3 σχηματίζουν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου, ενώ η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου [Stanway, (1990)].



Εικόνα 1.3.3: Δομή του καψιδίου των *Picornoviridae*. Αποτελείται από 12 πενταμερή όπου το κάθε πενταμερές περιλαμβάνει 5 πρωτομερή των πρωτεϊνών VP1, VP3 και VP0 (VP2 + VP4) [Bakker, Groppelli et al., (2014)]

Η εξωτερική επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται από προεξοχές και αυλάκωσεις. Σημαντικότερη είναι μια βαθιά αυλάκωση (canyon), η οποία διαμορφώνεται στη σύνδεση της VP1 με τη VP3 και εντοπίζεται περιμετρικά του άξονα πενταπλούς συμμετρίας. [Knipe and Howley, (2007)]. Έχει προταθεί ότι αυτή η αυλάκωση εμπλέκεται στην προσκόλληση του ιού σε υποδοχείς των κυττάρων – ξενιστών, αποτελώντας ταυτόχρονα και μία στρατηγική για την αποφυγή ανοσολογικής παρέμβασης από τον οργανισμό ξενιστή. Οι περιοχές εντός της αυλάκωσης, λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασής τους με κυτταρικούς υποδοχείς, διατηρούνται φυλογενετικά μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Αντίθετα, τμήματα του καψιδίου που κωδικοποιούν πρωτεϊνικά τμήματα του καψιδίου, εμφανίζονται λιγότερο συντηρημένα καθώς συσσωρεύουν μεταλλάξεις και είναι ποικιλόμορφα ως προς την τρισδιάστατη δομή τους. Η δυνατότητα αυτής της σημαντικής μεταβολής τους φαίνεται πως είναι ένα χαρακτηριστικό που εξελίχθηκε έτσι, ώστε οι περιοχές αυτές να λειτουργήσουν ως επίτοποι. Αν και οι επίτοποι αυτοί βρίσκονται σε σημεία ευπρόσιτα για τα αντισώματα, η ανοσολογική αντίδραση μπορεί να αποφευχθεί εξαιτίας της ευμεταβλητότητας των περιοχών αυτών [Stanway G., (1990)].

(1984)]. Οι συντηρημένες δευτεροταγείς δομές που περιέχει διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες της μετάφρασης και αντιγραφής του ιού. Περιλαμβάνει 7 ξεχωριστά δομικά στοιχεία (I-VII) και χωρίζεται σε 3 περιοχές: το cloverleaf (I) και στο IRES (Internal ribosome entry site) που περιλαμβάνει τα δομικά στοιχεία II-VI [Wimmer *et al.*, (1993)].



Εικόνα 1.4.1.1: Η 5' αμετάφραση περιοχή των εντεροϊών. Η δομή I αντιστοιχεί στο cloverleaf, ενώ οι δομές II-VI αποτελούν το IRES. Έξω από το IRES προς το 3' άκρο της 5'UTR βρίσκεται το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης [Wimmer *et al.*, (1993)].

Το cloverleaf αποτελεί ένα cis-acting γενετικό στοιχείο σχήματος τριφυλλιού, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του RNA και στην έναρξη της αντιγραφής του θετικής πολικότητας κλώνου (Melchers *et al.*, 2006). Τα δομικά στοιχεία IRES αποτελούν τον κύριο παράγοντα για τον τροπισμό και την παθογένεια των ιών (Kauder and Racaniello, 2004). Επιπλέον είναι απαραίτητα για την έναρξη της μετάφρασης καθώς τα ριβοσώματα και οι κυτταρικοί παράγοντες της μετάφρασης προσδένονται αρχικά στο εσωτερικό του IRES και στη συνέχεια μετακινούνται μέχρι το κωδικόνιο έναρξης ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης (Sharma *et al.*, 2004, Semler and Ertel, 2008).

Η VPg διαφορετικών picorna ιών ποικίλλει σε μέγεθος από 22-24 κατάλοιπα αμινοξέων και κωδικοποιείται από ένα μοναδικό ιικό γονίδιο. Η VPg είναι

ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το 5'-ουριδυλιωμένο τμήμα του ιικού RNA με δεσμό O₄-(5'-ουριδύλιο)-τυροσίνης. Η VPg πιστεύεται ότι συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και εγκλεισμό του γενώματος στο καψίδιο, ενώ δεν είναι απαραίτητη για την μόλυνση κυττάρων από τους εντεροϊούς. Το mRNA των εντεροϊών διαφέρει από το ιικό RNA μόνο στην έλλειψη της VPg. Τα ιικά mRNA που αλληλεπιδρούν με τα κυτταρικά ριβοσώματα δεν φέρουν τη VPg πρωτεΐνη, αλλά περιέχουν μόνο ουριδινο-5'-φωσφορικό (pU) στα 5' άκρα τους [Nomoto *et al.*, (1977)] Η αφαίρεση της VPg από το ιικό RNA καταλύεται από μια πρωτεΐνη του ξενιστή που ονομάζεται ένζυμο διαχωρισμού [Ambros *et al.*, (1978)]. Η VPg βρίσκεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, κάτι που οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του RNA [Nomoto *et al.*, (1977), Kitamura *et al.*, (1981), Pettersson *et al.*, (1978)].

1.4.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF

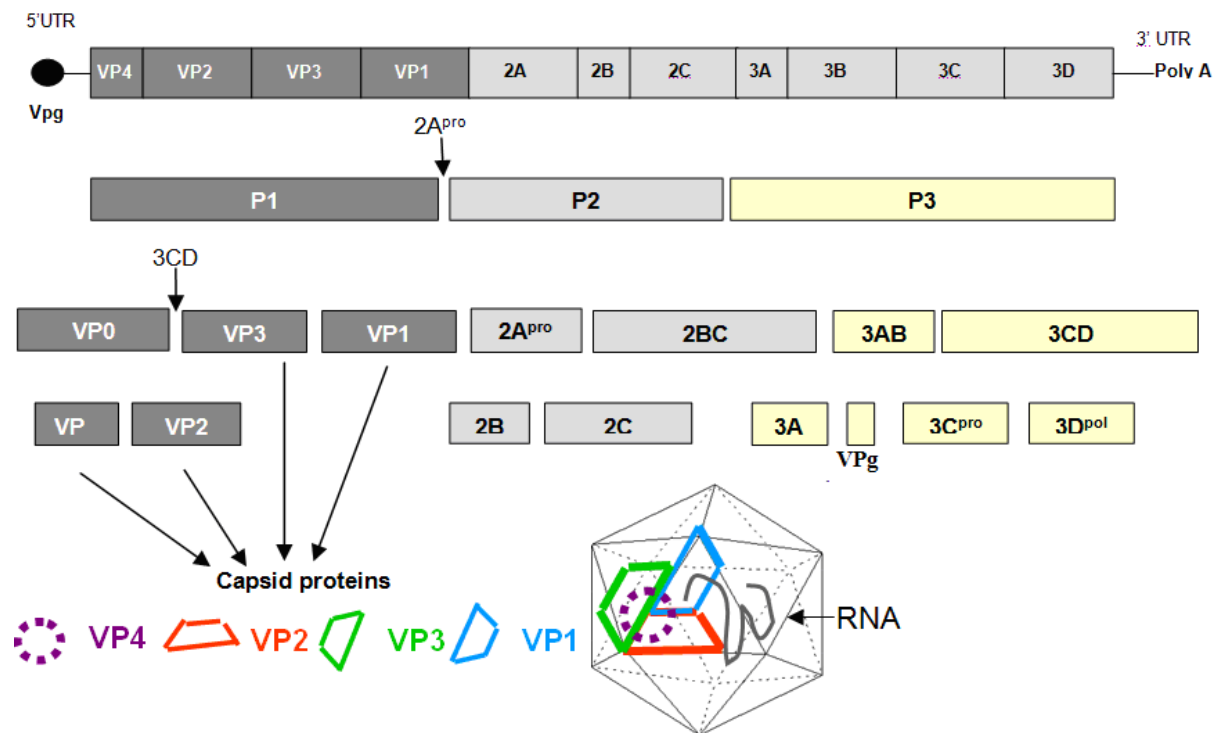
Βιοχημικές μελέτες που έγιναν σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊούς, προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA, το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ικές πρωτεΐνες [Summers, Maizel (1968)]. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ιικό RNA κωδικοποιεί για ένα μοναδικό ORF [Kitamura *et al.*, (1981), Racaniello, Baltimore *et al.*, (1981)]. Παρόμοια στρατηγική γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται κατά την αντιγραφή όλων των *picornaviruses*. Η αρχική πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά την μετάφραση, έτσι ώστε το πλήρες προϊόν να μην εμφανίζεται. Ο τεμαχισμός γίνεται από πρωτεϊνάσες που κωδικοποιούνται από το ιικό γένωμα για να αποδώσουν στο τέλος 11 με 12 τελικά προϊόντα τεμαχισμού. Μερικά από τα πρόδρομα μη τεμαχισμένα μόρια έχουν επίσης ορισμένες λειτουργίες κατά την αντιγραφή.

Η πολυπρωτεΐνη χωρίζεται σε τρεις περιοχές: P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες του ιού VP1, VP2, VP3 και VP4. Μοριακές μελέτες προτείνουν ότι η νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των διαφόρων οροτύπων εντεροϊών, καθώς η P1 γενωμική περιοχή παρέχει αξιόπιστη συσχέτιση της αλληλουχίας με τον ορότυπο, [Oberste *et al.*, (1999)]. οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν για τις λειτουργικές πρωτεΐνες. Υπάρχουν 7 βασικές λειτουργικές πρωτεΐνες οι 2^{Apro}, 2B, 2C, 3A, 3B^{VPg}, 3C^{pro} και 3D^{pol} και τα λειτουργικά ενδιάμεσα των περιοχών αυτών 2BC, 3AB και 3CD^{pro} [Stanway G., (1990)]. Σύμφωνα με συγκριτικές μελέτες μεταξύ μη δομικών πρωτεϊνών από διάφορους Picorna ιούς, οι λειτουργικές πρωτεΐνες είναι περισσότερο συντηρημένες από ότι οι καψιδιακές πρωτεΐνες.

1.4.3 Η 3' μη κωδική περιοχή (3' UTR)

Η 3' μη-κωδική περιοχή (3' untranslated region, 3'UTR) των εντεροϊών είναι μικρή, περίπου 72-100 νουκλεοτίδια, και φέρει επίσης μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA [Jacobson *et al.*, (1993)]. Η νουκλεοτιδική αυτή περιοχή αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA [Oberste *et al.*, (2006)]. Ωστόσο, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών για τη μόλυνση των κυττάρων [Brown *et al.*, (2005), Todd *et al.*, (1997)]. Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των εντεροϊών φέρει μια πολύ(A) ουρά [Yogo, Wimmer (1972)]. Το αρνητικής πολικότητας RNA φέρει μια 5' πολύ(U) ουρά, η οποία αντιγράφεται για να σχηματίσει την πολύ(A) του θετικού κλώνου [Yogo *et al.*, (1974)]. Ιικό RNA από το οποίο έχει αφαιρεθεί η πολύ(A) ουρά δεν είναι πια μολυσματικό [Spector, Baltimore (1974)].



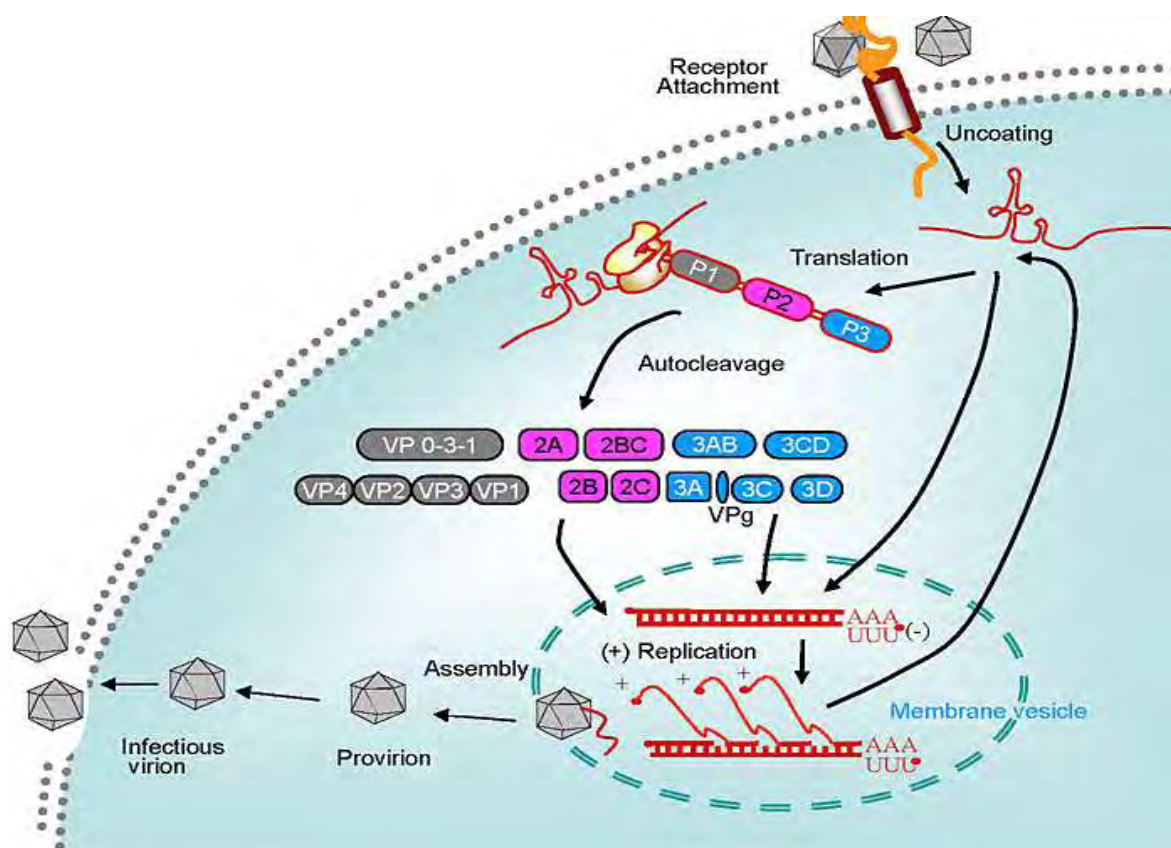
Εικόνα 1.4.3.1: Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών. Πάνω: διάγραμμα του ιικού RNA γενώματος, με την VPg πρωτεΐνη στο 5' άκρο, το 5' UTR, τα γονίδια των δομικών και μη-δομικών πρωτεϊνών, την 3' UTR και την πολύ(A) ουρά. Κάτω: Ο τεμαχισμός της αρχικής πολυπρωτεΐνης αρχικά σε τρεις περιοχές P1, P2 και P3, στη συνέχεια στα ενδιάμεσα των ικών πρωτεϊνών και τέλος στις τελικές πρωτεΐνες του ιού [Hober et al., (2013)].

2. Κύκλος ζωής των εντεροϊών

Η αντιγραφή των εντεροϊών πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα. Στη συνέχεια, το RNA απεκδύεται μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο καψίδιο. Μόλις το θετικής πολικότητας ιικό RNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, μεταφράζεται ώστε να παραχθούν οι ικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του γονιδιώματος και την παραγωγή νέων ικών σωματιδίων. Οι ικές πρωτεΐνες συντίθενται από μία πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται κατά τη σύνθεσή της. Οι τεμαχισμοί πραγματοποιούνται κυρίως από δύο ικές πρωτεΐνες, τις 2A^{pro} και 3C^{pro} ή 3CD^{pro}. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που συντίθενται, είναι και η ική RNA-εξαρτώμενη-RNA-πολυμεράση καθώς και βοηθητικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αντιγραφή του γονιδιώματος και τη του mRNA. Το πρώτο βήμα στην αντιγραφή του γονιδιώματος είναι η αντιγραφή του θετικής πολικότητας RNA για την παραγωγή του αρνητικής πολικότητας ενδιάμεσου. Αυτό το βήμα ακολουθείται από την παραγωγή πρόσθετων θετικών κλώνων. Αυτά τα γεγονότα λαμβάνουν χώρα σε μικρά μεμβρανικά κυστίδια που

επάγονται από διάφορες ιικές πρωτεΐνες. Όταν ο αριθμός των καψιδιακών πρωτεϊνών είναι επαρκής, αρχίζει η καψιδίωση. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται ώστε να παραχθεί ένα ανώριμο πρωτομερές, το οποίο στη συνέχεια συγκροτείται σε πενταμερή. Τα νέο-συντεθειμένα, θετικής πολικότητας RNA εισέρχονται στα καψίδια με τα πενταμερή και σχηματίζουν το μολυσματικό ιό.

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν κύκλο αντιγραφής κυμαίνεται από 5 με 10 ώρες και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως ο εκάστοτε ιός, η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστής και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης [Racaniello V. (2007)].



Εικόνα 2: Σύνοψη του κύκλου ζωής του πολιοϊού. (1) Σύνδεση σε κυτταρικό υποδοχέα και (2) απέκδυση του ιικού γενώματος. (3) Αφαιρείται η VPg από το ιικό RNA, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται. (4) Η πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά τη σύνθεσή της και παράγονται οι μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες. Η σύνθεση του RNA γίνεται σε μεμβρανικά κυστίδια. (5) Ο ιικός (+) RNA κλώνος αντιγράφεται από τις ιικές RNA πολυμεράσες για να σχηματιστούν πλήρους μήκους (-) RNA κλώνοι, (6) οι οποίοι αντιγράφονται στη συνέχεια για να παραχθεί επιπρόσθετο (+) RNA. (7) Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, ο νέο-συντεθειμένος (+) RNA κλώνος μεταφράζεται για να παράγει επιπρόσθετες ιικές πρωτεΐνες. (8) Στα τελευταία στάδια της μόλυνσης, οι (+) κλώνοι εισέρχονται στο μορφογενετικό μονοπάτι. (9) Τα νέο-συντεθειμένα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται από το κύτταρο με λύση [Hober et al., (2013)].

2.1 Προσκόλληση

2.1.1 Κυτταρικοί υποδοχείς και Συνυποδοχείς

Οι εντεροϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων ξενιστών τους, μέσω της πρόσδεσής τους σε κυτταρικούς υποδοχείς. Οι υποδοχείς είναι μακριά μόρια που προεξέχουν από την εξωκυτταρική επιφάνεια και συμμετέχουν στις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολιπίδια. Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR) [Mendelsohn CL *et al.*, (1989)]. Στους περισσότερους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη «αυλάκωση» και προκαλούν την αναδιάταξη του ιικού καψιδίου [Rossman *et al.*, (2002)]. Ωστόσο, υπάρχουν και υποδοχείς οι οποίοι συνδέονται εξωτερικά της «αυλάκωσης» και δεν αποσταθεροποιούν το ιικό καψίδιο. Η αλληλεπίδραση ενός εντεροϊού με τον υποδοχέα δεν είναι πάντα επαρκής για τη είσοδό του στο κύτταρο και απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου ή υποδοχέα (συνυποδοχέα).

Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει, εν μέρει, την παθογόνο δυναμική δράση ενός ιού, καθώς και τη φύση της ασθένειας που προκαλεί. Συγκεκριμένα για τους ευρέως μελετημένους πολιοϊούς, ο κυτταρικός υποδοχέας είναι ο CD155 ή PVR (poliovirus receptor). Η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των πολιοϊών αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές. Αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραμάτων έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή είναι η περιοχή που φέρει τη θέση σύνδεσης των πολιοϊών [Koike *et al.*, (1991), Racaniello (1992)].

Οι αύλακες στο καψίδιο των πολιοϊών είναι οι θέσεις αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Οι αύλακες αυτές είναι πάρα πολύ βαθιές ώστε να μην επιτρέψουν τη διείσδυση αντισωμάτων, [Rossman (1989)]. Αυτό το φυσικό εμπόδιο πιστεύεται ότι κρύβει αμινοξέα, κρίσιμα για τη δέσμευση από τον υποδοχέα. Μεταλλάξεις στα αμινοξέα που σχηματίζουν την αύλακα μπορούν να αλλάξουν την

συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς [Colston E., Racaniello V.R. (1994), Colston E.M., Racaniello V.R. (1995), Harber J. *et al.*, (1995), Liao, Racaniello (1997)]

Μόλις οι εντεροϊοί έχουν προσκολληθεί στους κυτταρικούς τους υποδοχείς, το ιικό καψίδιο πρέπει να απομακρυνθεί ώστε να ελευθερωθεί το RNA γονιδίωμα, το οποίο θα εισέλθει στη συνέχεια στο κυτταρόπλασμα, τη θέση αντιγραφής των εντεροϊών. Η ελευθέρωση του γονιδιώματος είναι επακόλουθο του χαμηλού pH ή της δραστηριότητας ενός συνυποδοχέα.

2.1.2 Δημιουργία πόρου στην κυτταρική μεμβράνη

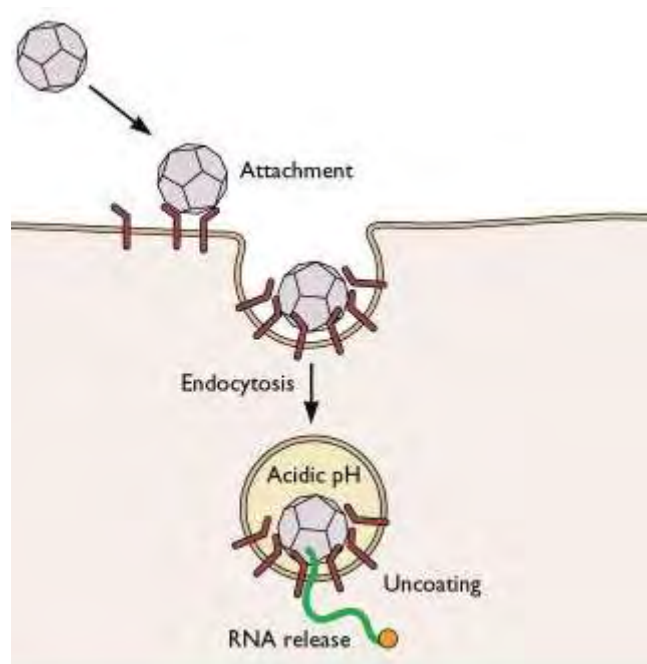
Η αλληλεπίδραση του πολιοϊού με τον υποδοχέα του PVR, οδηγεί σε σημαντικές δομικές αλλαγές στον ιό. Τα σωματίδια που προκύπτουν, τα οποία καλούνται altered ή A σωματίδια, περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική καψιδιακή πρωτεΐνη VP4. Επιπρόσθετα, η N-τελική περιοχή της VP1, η οποία φυσιολογικά βρίσκεται στον εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται στην επιφάνεια των A σωματιδίων [Fricks *et al.*, (1990)]. Αυτή η αλληλουχία της VP1 είναι υδρόφοβη και ως αποτέλεσμα τα A σωματίδια έχουν αυξημένη συγγένεια για τις μεμβράνες σε σύγκριση με τα ισωμάτια. Σε μία υπόθεση για την είσοδο των πολιοϊών, η πρόσδεση στον υποδοχέα, οδηγεί στις παρακάτω αλλαγές: το εκτεθειμένο λιπόφιλο N-τελικό άκρο της VP1 εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη και δημιουργεί έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Η εύρεση ότι τα A σωματίδια, όταν προστίθενται σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες, επάγουν το σχηματισμό ενός καναλιού ιόντος, υποστηρίζει την παραπάνω υπόθεση [Tosteson MT, *et al.*, (1997)].

Δεν είναι γνωστό εάν η VP4 καθώς ελευθερώνεται από το ιικό καψίδιο αφήνει το κύτταρο ή συμμετέχει στη δημιουργία του πόρου, αλλά είναι σαφές ότι αυτή η πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τα αρχικά στάδια εισόδου του ιού στο κύτταρο. Ένας ιός που περιέχει μία μετάλλαξη στο 28^ο αμινοξύ της VP4 μπορεί να προσδεθεί στα κύτταρα και να μετατραπεί σε A σωματίδια, τα οποία όμως μπλοκάρονται σε επακόλουθο στάδιο κατά την είσοδο του ιού [Moscufo N., *et al.*, (1993)]. Αμινοξικές αλλαγές σε αυτή τη θέση της VP4 μειώνουν την αγωγιμότητα του καναλιού ιόντος και τη μετατόπιση του ιικού RNA [Danthi *et al.*, (2003)]. Όλα αυτά αποδεικνύουν ότι η VP4 διαδραματίζει έναν περισσότερο κεντρικό ρόλο στη

δημιουργία του πόρου από ότι πίστευαν προηγουμένως.

Δεν είναι γνωστό εάν το RNA εισέρχεται στο κύτταρο από την κυτταρική μεμβράνη ή από τη μεμβράνη των ενδοσωμάτων. Παρόλο που είναι πιθανό το RNA να εισέρχεται είτε στο πλάσμα είτε στη μεμβράνη των ενδοσωμάτων, η ενδοκύτωση από μόνη της δεν είναι επαρκής να οδηγήσει στην απέκδυση του πολιοϊού [Racaniello (2007)].

Αξίζει να σημειωθεί, πως πολλοί από τους ιούς αυτούς χρησιμοποιούν συστήματα σηματοδότησης του κυττάρου-ξενιστή για την ενεργοποίηση συνυποδοχέων, την επαγωγή ενδοκυτταρικών αποκρίσεων αλλά και την επαγωγή ενδοκυτταρικών συνθηκών, ευνοϊκών για την μόλυνση. Η σηματοδότηση που ξεκινά στην κυτταρική μεμβράνη πιθανότατα μπορεί να συνεχίσει σε κυτταροπλασματικά οργανίδια (π.χ. ενδοσώματα) [Kew (1993)]. Ανάλογα με τον ιό, τους υποδοχείς και το κύτταρο-ξενιστή, η αρχική σύνδεση στους υποδοχείς μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση κινάσων τυροσίνης ή άλλων κινάσων, οι οποίες με τη σειρά τους, θα εκκινήσουν καταρράκτες αποκρίσεων στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα [Pelkmans *et al.*, (2004), Greber (2002), Tagawa *et al.*, (2005)]. Η επαγόμενη από τον ιό σηματοδότηση εξαρτάται από δεύτερους αγγελιαφόρους (phosphatidylinositides, διακυλογλυκερίδια, και ασβεστίου), και άλλους ρυθμιστές της μεταφοράς διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.



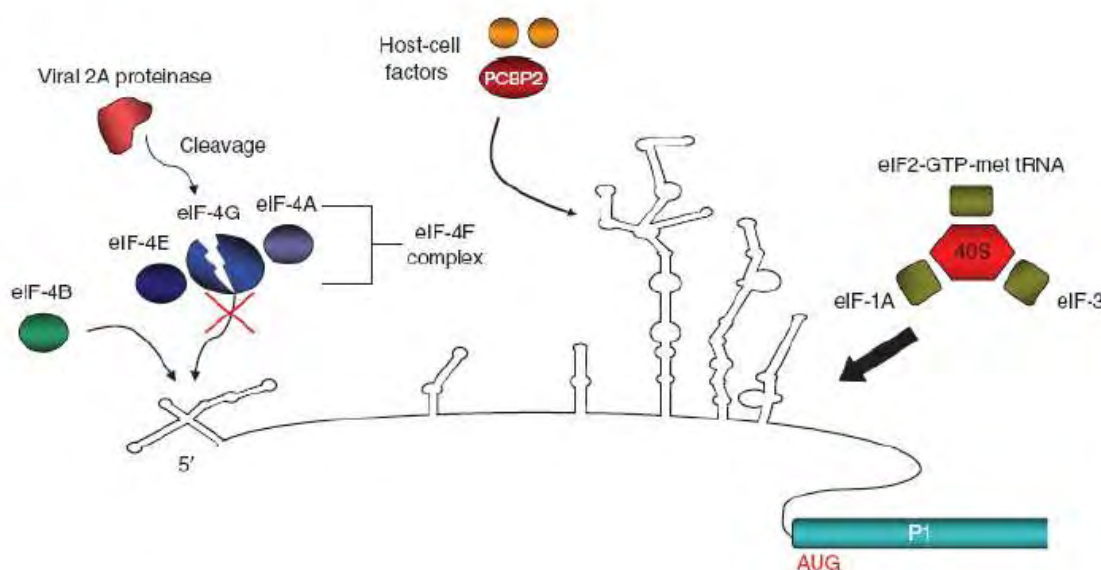
Εικόνα 2.1.2.1: Μοντέλο εισόδου των εντεροϊών στο κύτταρο. Το αρχικό ιοσωμάτιο προσδένεται στον υποδοχέα και υφίσταται μια αλλαγή στην διαμόρφωση επαγόμενη από τον υποδοχέα, η οποία οδηγεί στην παραγωγή των τροποποιημένων σωματίων Α. Το ιικό RNA εξέρχεται από το σωματίο από την πλασματική μεμβράνη ή διαμέσω των ενδοσωμάτων [Racaniello (2007)].

2.2 Μετάφραση του ιικού RNA

Μόλις το θετικής πολικότητας RNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, πρέπει να μεταφραστεί γιατί δεν μπορεί να αντιγραφεί από καμία κυτταρική RNA πολυμεράση. Το θετικής πολικότητας RNA στερείται δομών 5' καλύπτρας, είναι όμως συνδεδεμένο με την ιική πρωτεΐνη VPg, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο [Ambros *et al.*, (1980)]. Επιπλέον το γονιδίωμα των εντεροϊών μεταφράζεται αποτελεσματικά σε μολυσμένα κύτταρα παρά την αναστολή της μετάφρασης του κυτταρικού mRNA. Νουκλεοτιδική αλληλούχιση του θετικού κλώνου του πολιοϊού αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο, που περιέχει επτά AUG κωδικόνια [Kitamura *et al.*, (1981), Racaniello (b) (1981)]. Παρόμοιες περιοχές βρέθηκαν στη συνέχεια και σε άλλους Picorna ιούς, αποδεικνύοντας την ύπαρξη υψηλά δομημένων RNA-δομών [Rivera *et al.*, (1988), Skinner *et al.*, (1989)]. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα αντί να σαρώνουν τις 5'-αμετάφραστες περιοχές για τον εντοπισμό κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης χρησιμοποιούν μια εσωτερική θέση δέσμευσης στο 5'- άκρο, την εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος *IRES (Internal Ribosome Entry Site)*, όπου προσδένεται η 40S υπομονάδα του ριβοσώματος και ξεκινάει η μετάφραση [Racaniello (2007)]

Για τη μετάφραση του ιικού RNA είναι απαραίτητοι σχεδόν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (eIFs) των ευκαρυωτικών κυττάρων με εξαίρεση τον eIF4E, ο οποίος προσδένεται στην καλύπτρα cap των ευκαρυωτικών κυττάρων [Ochs *et al.*, (2002)]. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό παρατηρείται κόψιμο του παράγοντα eIF4G1 και προκύπτει ένα N-τελικό και ένα C-τελικό τμήμα. Το ιικό RNA συνδέεται απευθείας με αυτόν τον παράγοντα στην περιοχή IRES και στρατολογεί τους παράγοντες eIF3 και eIF4 μέσω της αλληλεπίδρασης με το C-τελικό τμήμα του eIF4G1. Έτσι, σχηματίζεται το σύμπλοκο eIF4F. Η μικρή υπομονάδα 40S δημιουργεί σύμπλοκο με του παράγοντες eIF1A και eIF2-GTP-Met-tRNA και συνδέεται με το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο eIF4F – ιικό RNA, σχηματίζοντας το 43S προεναρκτήριο σύμπλοκο, το οποίο κινείται με κατεύθυνση 5' -3' κατά μήκος του IRES, έως ότου συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης [Prevot *et al.*, (2003)]. Στο στοιχείο IRES προσδένονται και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες ενισχύουν

τη μετάφραση ή ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA. Έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA: η πρωτεΐνη PTB (polypyrimidine tract-binding protein) των 57kDa η οποία προσδένεται στην πολυπυριμιδική περιοχή, η poly(rC) πρωτεΐνη PCBP2 [poly(rC)-binding protein2] 39 kDa, το αυτοαντιγόνο La 52kDa και η Unr (Upstream of N-Ras) [Ochs *et al.*, (2002)]. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να είναι απαραίτητες αλλά όχι επαρκείς από μόνες τους για την έναρξη της μετάφρασης [Hunt S.L., (1999)].



Εικόνα 2.2.1: Οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης και η πρόσδεσή τους στο στοιχείο IRES [Semler and Ertel, (2008)]

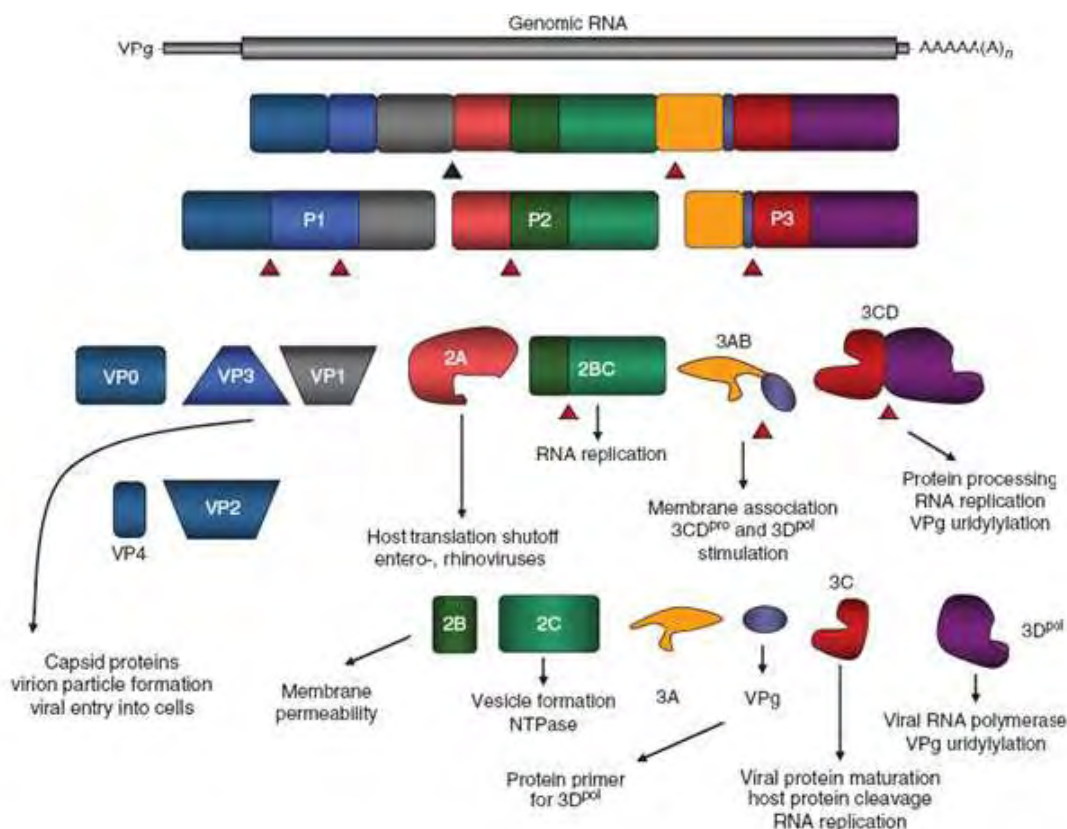
2.3 Επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης

Η σύνθεση πολλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA γονιδίωμα επιτυγχάνεται λόγω της μετάφρασης ενός μοναδικού ORF το οποίο στη συνέχεια τεμαχίζεται από ικές πρωτεάσες. Η πολυπρωτεΐνη (250kDa) δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται μόλις μεταφραστούν οι περιοχές που κωδικοποιούν για πρωτεάσες. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται συμμεταφραστικά από ενδομοριακές αντιδράσεις (*in cis*), που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενη από δευτερεύουσες επεξεργασίες *in cis* ή *in trans* (διαμοριακές). Το γονιδίωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για τρεις πρωτεΐνάσες, την Lpro, την 2A^{pro} και την 3C^{pro} ή 3CD^{pro} [Racaniello (2007)].

Σε κύτταρα μολυσμένα με εντεροϊούς, ο αρχικός τεμαχισμός μεταξύ της P1 και P2 επάγεται από την 2A^{pro}. Διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες πρωτεολύονται από την 2A^{pro}, συμπεριλαμβανομένων και των eIF4GI, eIF4GII και Pabp. Στην πρόδρομη πρωτεΐνη των εντεροϊών, η θέση τεμαχισμού για την 2A^{pro} είναι μεταξύ της τυροσίνης και της γλυκίνης. Όλοι οι picorna ιοί κωδικοποιούν την 3C^{pro}, η οποία πραγματοποιεί μια αρχική πρωτεόλυση μεταξύ των περιοχών 2C και 3A. Σε αντίθεση με τις άλλες πρωτεΐνες των ιών αυτών, η 3C^{pro} πραγματοποιεί και δευτερεύουσες πρωτεολύσεις των P1 και P2 πρόδρομων μορίων. Η 3C^{pro} των εντεροϊών τεμαχίζει μόνο διπεπτίδια Gln-Gly [Racaniello (2007)].

Τόσο η 3C^{pro} όσο και η 2A^{pro} είναι ενεργές στο πολυπεπτίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από αυτό με αυτό-τεμαχισμό. Μόλις ελευθερωθούν οι πρωτεΐνες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη in trans. Σε κύτταρα μολυσμένα με εντεροϊούς, το αρχικό γεγονός αποτελεί η απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της 2A^{pro}. Στη συνέχεια η 3CD^{pro} απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτικό τεμαχισμό. Αυτή η πρωτεΐνη, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, πραγματοποιεί δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπτίδια γλουταμινικού-γλυκίνης στον τύπου 1 πολιοϊό πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την 3C^{pro}. Τόσο η 3C^{pro} όσο και η 3CD^{pro} επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστηριότητα. Σε μία αλληλουχία γεγονότων διάσπασης in-trans από την 3CD^{pro}, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3C^{pro}, 3D^{pol} και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Η 3D^{pol} αλληλουχία μέσα στην 3CD^{pro} απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστική επεξεργασία από το 3C^{pro} μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Ένα πλεονέκτημα της στρατηγικής αυτής είναι ότι η έκφραση μπορεί να ελεγχθεί από το ρυθμό και την έκταση την πρωτεολυτικής διαδικασίας. Εναλλακτική χρήση των θέσεων πρωτεόλυσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πρωτεϊνών με διαφορετικές δραστηριότητες. Η παρουσία πολλαπλών δράσεων σε μια μοναδική πρωτεΐνη δεν υπάρχει στις ευκαρυωτικές πρωτεΐνες

και είναι ένα παράδειγμα του πως η χωρητικότητα των μικρών ιικών γενωμάτων μπορεί να μεγιστοποιηθεί [Racaniello (2007)].



Εικόνα 3.3.1: Επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης. Καθώς η πολυπρωτεΐνη μεταφράζεται, η αυτοκατάλυση από τις ικές πρωτεάσες 2A και 3C/3CD έχει σαν αποτέλεσμα τα πρόδρομα μόρια P1, P2, P3, από τα οποία προκύπτουν οι δομικές (P1) και μη δομικές (P2 και P3) πρωτεΐνες [Semler and Ertel, (2008)].

2.4 Αντιγραφή του Ιικού RNA

Με την ολοκλήρωση της μετάφρασης του ιικού γενώματος και την έκφραση των ιικών γονιδίων, το ικό RNA χρησιμεύει σαν μήτρα για την παραγωγή ενός συμπληρωματικού μορίου RNA(-) πολικότητας, το οποίο χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για τη σύνθεση πολλών νέων κλώνων RNA θετικής πολικότητας της θυγατρικής γενιάς [Murray and Barton, (2003)]. Ένα μοντέλο αντιγραφή του RNA θα μπορούσε να είναι το εξής: ικό RNA(+)→σύνθεση RNA(-)→RF→ σύνθεση RNA(+)->RI-> RNA(+) όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη. Η

σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών [Novak, Kirkegaard, (1991)].

Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της αντιγραφής είναι η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Η RNA πολυμεράση του ιού ($3D^{pol}$) παράγεται έπειτα από τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης $3CD^{pro}$, η οποία είναι άκρως δραστική ως πρωτεΐνωση αλλά δεν έχει δράση πολυμεράσης [Wickman (1907), Rieder *et al.*, (2000)].

Η $3D^{pol}$ είναι ένα ένζυμο που για να δράσει απαιτεί την παρουσία εκκινητή. Σε πειράματα *in vitro* η $3D^{pol}$ δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινητή. Τον ρόλο του εκκινητή στους εντεροϊούς έχει η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά επίσης και στο 5'-άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίσει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην κωδική περιοχή των εντεροϊών [Wickman (1907), Rieder (2000)]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η cre-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg γίνεται μόνο κατά τη σύνθεση των θετικών κλώνων και όχι στη σύνθεση των αρνητικών [Morasco *et al.*, (2003), Murray, Barton (2003)].

Η διαδικασία της αντιγραφής,, ξεκινά με την ολοκλήρωση της μετάφρασης, μετά την απομάκρυνση των ριβοσωμάτων από το RNA. Τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου, του συμπλέγματος Golgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου, δημιουργούν τα αντιγραφικά κυστίδια στα οποία λαμβάνει χώρα η αντιγραφή. Στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των κυστιδίων, δημιουργείται ένα σύμπλοκο αντιγραφής το οποίο αποτελείται από ικές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση $3D^{pol}$, η $2C^{ATPase}$, η 3A, η 3B, οι πρόδρομες πρωτεΐνες 2BC και 3AB καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2. Μέρος του συμπλόκου αυτού αποτελεί και το ιικό RNA, που περιέχει cis-acting όπως η δομή "cloverleaf" που βρίσκεται στην 5'-UTR και η δομή CRE η οποία εντοπίζεται στην 2C κωδική περιοχή [Egger *et al.*, (2000), Egger *et al.*, (2002), Semler and Ertel, (2008)].

Οι ικές πρωτεΐνες 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει

την 3D^{pol} και την 3CD^{pro}, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ιικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής [Echeverri, Dasgupta (1995)]

Το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA. Η κυκλοποίηση του γενώματος είναι απαραίτητη για την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων ιικών και κυτταρικών παραγόντων. Σχηματίζεται μία γέφυρα πρωτεϊνών μεταξύ των PCB2 και 3CD που είναι συνδεδεμένες στο cloverleaf και των PABP και 3CD που είναι συνδεδεμένες στην πολύ(A) ουρά και την 3'UTR αντίστοιχα [Lyons *et al.*, (2001), Semler and Ertel, (2008)]. Με την κυκλοποίηση αυτή εμποδίζεται η πρόσβαση των ριβοσωμάτων στο RNA, επάγοντας έτσι τη μετάβαση από τη μετάφραση στην αντιγραφή. Επιπλέον αυτός ο μηχανισμός αντιγραφής εξασφαλίζει ότι μόνο τα πλήρους μήκους RNA θα αποτελέσουν εκμαγεία για την 3D^{pol} [Andino *et al.*, (1993), Semler and Ertel, (2008)]. Ωστόσο, από πειραματικά στοιχεία, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα [Gamarnik, Andino (1998)].

2.5 Καψιδίωση - Σχηματισμός νέων ιικών σωματιδίων

Κατά τη σύνθεση της P1 πρωτεΐνης, της πρόδρομης καψιδιακής πρωτεΐνης, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β-βαρελίου και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Μόλις η P1 ελευθερωθεί από τη 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 πέπτονται από την πρωτεΐνάση 3CD^{pro}. Οι θέσεις κοπής βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελίων. Στο ώριμο καψίδιο, το καρβοξυτελικό άκρο των VP1, VP2 και VP3 βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το αμινοξυτελικό άκρο στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Αυτή η διαδικασία παράγει το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, την ανώριμη δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο της VP0, VP3 και VP1. Πέντε πρωτομερή στη συνέχεια συγκροτούνται για το σχηματισμό ενός

πενταμερούς, με συντελεστή καθίζησης 14S [Nomoto *et al.*, (1977), Novak (1991)].

Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει την πέψη των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 και VP2. Η πρωτεΐνωση η οποία πραγματοποιεί τον τελευταίο αυτό τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί. Ο δεσμός της VP0 που πέπτεται, βρίσκεται στο εσωτερικό των καψιδίων και στα ώριμα ιικά σωματίδια και δεν είναι προσιτός από ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες [Nomoto *et al.*, (1977), Novak (1991)].

Η καψιδίωση των picorna ιών είναι εξαιρετικά ειδική και οδηγεί στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι του ιικού mRNA, του αρνητικού κλώνου RNA ή οποιουδήποτε κυτταρικού RNA [Nomoto *et al.*, (1977), Novak (1991)]. Η VPg δεν αποτελεί σήμα καψιδίωσης, καθώς ο αρνητικός κλώνος RNA που περιέχει VPg δεν πακετάρεται. Η σύνδεση της καψιδίωσης με τη σύνθεση του ιικού RNA μπορεί να εξηγήσει την εκλεκτικότητα του πακεταρίσματος με τον ιικό θετικό κλώνο RNA.

Κατά τη σύνθεσή της, η P1 πρόδρομη καψιδιακή πρωτεΐνη, συνδέεται με μυριστικό οξύ, σε ένα κατάλοιπο γλυκίνης στο αμινοξυτελικό άκρο της VP4, το οποίο είναι εκτεθειμένο μετά την απομάκρυνση του εναρκτήριου καταλοίπου Met [Chow *et al.*, (1987)]. Οι ομάδες μυριστικού, που σχηματίζουν μέρος του δικτύου αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπομονάδων, όταν τα πρωτομερή συγκροτούνται σε πενταμερή, συγκεντρώνονται γύρω από τον πενταπλό άξονα συμμετρίας και σταθεροποιούν τον β-κύλινδρο που σχηματίζεται από τα αμινοξυτελικά άκρα πέντε αντιγράφων της VP3. Μεταλλάξεις υποδεικνύουν ότι οι ομάδες μυριστικού διαδραματίζουν ρόλο στη σταθεροποίηση των πενταμερών και έτσι των ιικών σωματιδίων [Ansardi *et al.*, (1994), Marc *et al.*, (1989), (1990), (1991), Moscufo and Chow (1992)]

Κάτω από πειραματικές συνθήκες ο κύκλος ζωής των εντεροϊών είναι πολύ γρήγορος, καταλήγοντας στο θάνατο του κυττάρου ξενιστή περίπου 7-8 ώρες μετά τη μόλυνση. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης [Tucker (1993)]. Όταν τα κύτταρα μολυνθούν παραγωγικά με εντεροϊό, αναπτύσσουν τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές, γνωστές και ως κυτταροπαθογόνες επιδράσεις. Αυτές περιλαμβάνουν τη συμπίκνωση της χρωματίνης, τον πολλαπλασιασμό των μεμβρανικών κυστιδίων, αλλαγές στη

διαπερατότητα της μεμβράνης, διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών και τη σταδιακή αποικοδόμηση ολόκληρου του κυττάρου. Η αιτία των κυτταροπαθολογικών επιδράσεων είναι άγνωστη. Μία υπόθεση είναι ότι η διαρροή των λυσοσωματικών περιεχομένων είναι εν μέρει υπεύθυνη [Guskey (1970)].

3. Παθογένεια

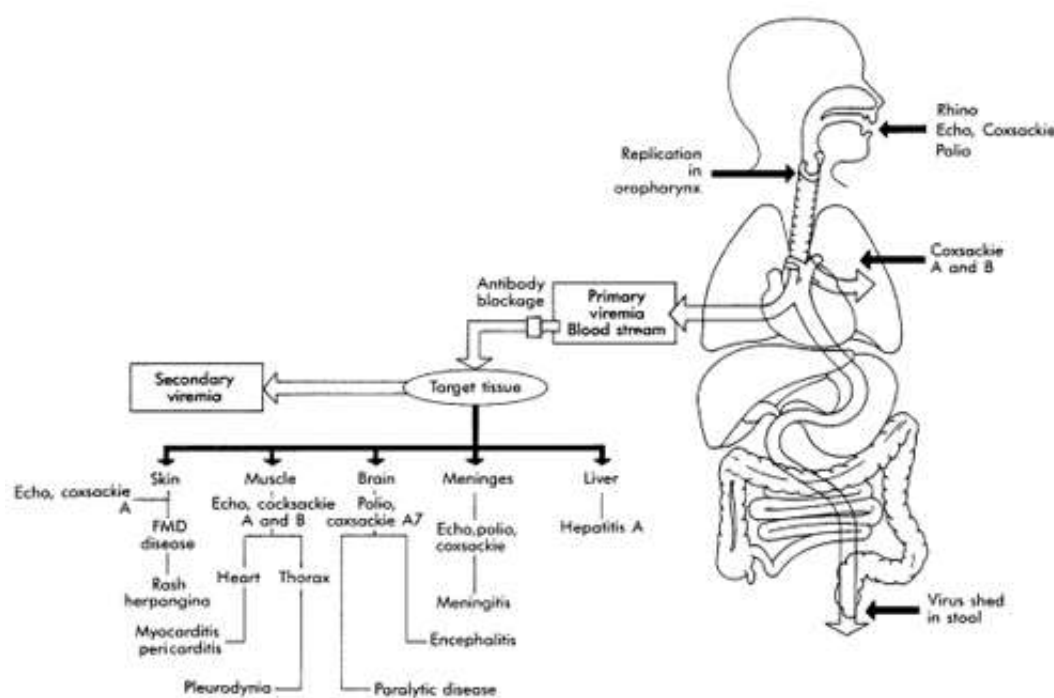
Η ιική παθογένεια είναι η διαδικασία που λαμβάνει χώρα όταν ένας ιός μολύνει έναν ξενιστή. Γνωρίζουμε ότι μιλώντας για ιούς, αναφερόμαστε σε υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα των ζωντανών κυττάρων και των ιστών. Τα κύτταρα που στοχεύονται από ιούς κατά την μόλυνση επιβιώνουν, διαφοροποιούνται, και λειτουργούν σε έναν ιστό που έχει μια περίπλοκη σχέση με άλλους ιστούς και φυσιολογικές διεργασίες στον ανέπαφο ξενιστή.

Η μόλυνση με εντεροϊό ξεκινά από το πεπτικό σύστημα και η είσοδος του εντεροϊού γίνεται κυρίως από το στόμα, με εξαίρεση τους Coxsackie A21 (CAV21) και EV70, στους οποίους ο πρώτος μεταδίδεται κυρίως από εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος και ο δεύτερος εκκρίνεται στα δάκρυα και μεταδίδεται μέσω των δακτύλων και των κοπράνων [Knipe and Howley, (2007)]. Αρχικά οι εντεροϊοί πολλαπλασιάζονται στον λεμφικό ιστό του φάρυγγα και στο λεπτό έντερο και προκαλείται ιαιμία, που οδηγεί σε περαιτέρω πολλαπλασιασμό του ιού σε κύτταρα του ενδοθηλιακού συστήματος και τελικά στο όργανο-στόχο. Ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας, είναι συνήθως 7 – 14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2 – 35 ημέρες, σε ακραίες περιπτώσεις. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό, ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για 1 – 2 εβδομάδες. Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί εκτός από κόπρανα και φαρυγγικά επιχρίσματα και από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, από το νωτιαίο μυελό, από τον εγκέφαλο, την καρδιά, τον επιπεφυκότα και από πληγές του δέρματος ή από βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών [Melnick J.L., (1990)].

Κάθε εντεροϊός έχει και το δικό του όργανο-στόχο. Πιο αναλυτικά οι πολιοϊοί μπορούν να προσβάλλουν τα επιχώρια λεμφογάγγλια. Τότε εμφανίζονται τα πρώτα μη ειδικά συμπτώματα όπως κακή διάθεση, πυρετός, κεφαλαλγία και έμετος.

Εφόσον προσβάλλονται κύτταρα του Κ.Ν.Σ. μπορεί να προκύψει μη παραλυτική πολιομυελίτιδα (1-2%) ή παράλυση των σκελετικών μυών, του παγκρέατος, του δέρματος και των βλεννωδών μεμβρανών [Muir *et al.*, (1998)]. Οι Coxsackie-ιοί και οι ECHO-ιοί μπορούν να προκαλέσουν ένα ευρύτερο φάσμα νόσων.

Οι κλινικές εκδηλώσεις των εντεροϊών ποικίλουν από ασυμπτωματικές μολύνσεις μέχρι την εκδήλωση μυοκαρδίτιδας, εγκεφαλοπάθειας αλλά και χαλαρής παράλυσης. Η έκβαση της κλινικής εικόνας έπεται από μόλυνση με εντεροϊούς σχετίζεται με την ηλικία αλλά και το ανοσολογικό επίπεδο του ασθενούς [G.Palacios and MS Oberste (2005)].



Εικόνα 4.1: Παθογένεια εντεροϊών [G.Palacios and MS Oberste (2005)]

4. Εξέλιξη των εντεροϊών

Η γενετική αλλαγή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εξέλιξη. Οι μηχανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για την μεγάλη γενετική ποικιλομορφία των εντεροϊών είναι δύο: i) οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του ιικού RNA, αλλά και ii) ο μοριακός ανασυνδυασμός [Domingo E., Holland J.J (1997)].

4.1 Μεταλλάξεις

Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων ($4,5 \times 10^{-4}$ μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής) οφείλεται στην επιρρεπή σε λάθη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση ($3D^{pol}$) η οποία υπολογίζεται ότι έχει συχνότητα λάθους ένα στα 10^3 έως 10^4 νουκλεοτίδια ανά κύκλο αντιγραφής και στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών. Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των RNA λυτικών ιών. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει ως συνέπεια την εξέλιξη των εντεροϊών και οδηγεί στην αντιγραφή τους κοντά στο όριο της καταστροφής [Wimmer E. *et al.*, (1993)]. Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων οδηγεί και στην ύπαρξη πληθυσμών πολλών διαφορετικών γενοτύπων που χαρακτηρίζονται ως 'quasi-species' (περίπου είδη). Ο όρος αυτός έχει εισαχθεί για να περιγράψει το φαινόμενο της ύπαρξης μιας μεγάλης ομάδας συσχετιζόμενων γονιδιωμάτων, που έχουν γενικά μία κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους σε μία ή περισσότερες περιοχές [Domingo *et al.*, (1985)]. Αυτή η γενετική ετερογένεια επιτρέπει στους εντεροϊούς να προσαρμόζονται γρήγορα σε ένα νέο περιβάλλον.

Οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις αποτελούν τις συχνότερες μεταλλάξεις. Μεταξύ αυτών, οι μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η μετάλλαξη A→G είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες [Figlerowicz M. *et al.*, (2003)].

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των εντεροϊών είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3. Οι περιοχές αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Αποτέλεσμα αυτού, είναι ότι ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά στις μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών. Η δομή του καψιδίου πρέπει να διατηρείται σταθερή, καθώς και οι περιοχές που σχετίζονται με

την αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα ή την αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα.

Επίσης, διάφορα cis-acting γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή (cloverleaf και CRE) ή στην ιική μετάφραση (IRES) δέχονται ακόμα πιο μικρή εξελικτική πίεση. Συγκεκριμένα, σε αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariance) κατά το οποίο έχουμε διατήρηση χαρακτηριστικών δευτεροταγούς δομής μεταξύ διαφορετικών ιών, παρά τις νουκλεοτιδικές διαφορές τους (λόγω μεταλλάξεων). Η αλληλουχία, αντίθετα, που κωδικοποιεί για τις μη δομικές πρωτεΐνες φαίνεται να είναι πιο συντηρημένη.

Μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελεί μία συμβίωση γονιδίων όπου το καθένα από αυτά εξελίσσεται ανεξάρτητα από τα άλλα, δηλαδή φαίνεται ότι οι καψιδιακές πρωτεΐνες, οι μη δομικές πρωτεΐνες και οι μη κωδικές περιοχές εξελίσσονται ανεξάρτητα [Lukashev *et al.*, (2003)].

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που ερμηνεύει τον διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης των διαφόρων γενωμικών περιοχών ενός εντεροϊού είναι ο ομοτυπικός ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών συνυπαρχόντων γενεαλογιών, ο οποίος όμως δεν μπορεί να αναγνωριστεί. Η ευκολία με την οποία συμβαίνει ο ετεροτυπικός ανασυνδυασμός δείχνει ότι ο ομοτυπικός συμβαίνει ακόμα πιο συχνά [Cherkasova *et al.*, (2002)].

4.2 Ανασυνδυασμός

Ο γενετικός ανασυνδυασμός αποτελεί έναν πιο ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης από τις μεταλλάξεις, καθώς μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων σε έναν ιό με ένα και μόνο γεγονός [Guillot *et al.*, (2000)]. Με τον όρο ανασυνδυασμό αναφερόμαστε στον σχηματισμό νέων, ομοιοπολικά συνδεδεμένων συνδυασμών γενετικού υλικού προερχόμενα, είτε από δύο διαφορετικά πατρικά γενώματα, είτε από διαφορετικές πλευρές του ίδιου γενώματος. Πρόκειται για έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό γενετικής ποικιλομορφίας, που συμβάλλει σε πολύ σημαντικές και κρίσιμες φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες των κυττάρων. Γενετικός ανασυνδυασμός έχει βρεθεί τόσο στους DNA όσο και στους RNA ιούς

[Boehmer, Nimonkar (2003), King AMQ (1988), Nagy, Simon (1997), Plyusnin *et al.*, (2002)].

Μελέτες προσδιόρισαν ότι η ανταλλαγή γενετικών στοιχείων συμβαίνει με συχνότητα ισότιμη με αυτή της ενσωμάτωσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή, και επίσης ότι η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από το βαθμό της ομολογίας μεταξύ των πατρικών RNA κλώνων και από την απόσταση μεταξύ των γενετικών δεικτών. *In vivo* μελέτες έδειξαν ότι το 10-20% των ιικών γενωμάτων μπορεί να υφίστανται γενετικό ανασυνδυασμό κατά τη διάρκεια ενός μόνο κύκλου αναδιπλασιασμού [Duggal *et al.*, (1997)]. Το ποσοστό του ανασυνδυασμού ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ιών.

Η ικανότητα λειτουργίας της RNA-πολυμεράσης, οι αμινοξικές υποκαταστάσεις στο ένζυμο, η πρωτογενής ακολουθία του RNA αλλά και η ομολογία ακολουθίας μεταξύ του αρχικού κλώνου και του κλώνου-δέκτη επηρεάζουν την εμφάνιση ανασυνδυασμού στο ιικό RNA [G.Palacios and MS Oberste (2005)].

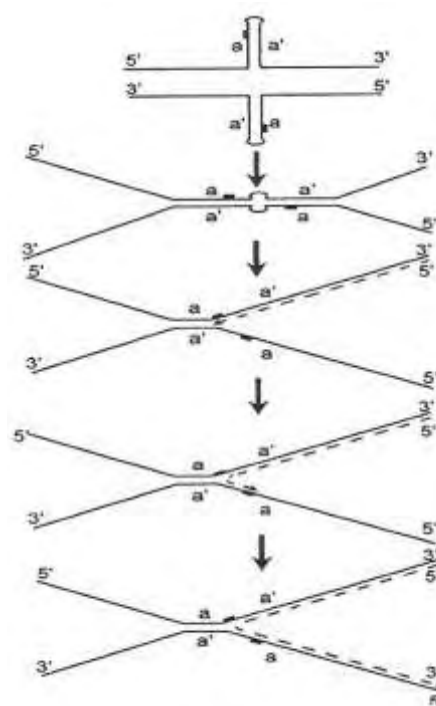
Ο ανασυνδυασμός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών. Ευνοεί την εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή οδηγώντας στην διατήρηση ενός γενοτύπου αγρίου τύπου. Επίσης, συμβάλλει στην δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση όπως π.χ. η βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Τέλος, επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου (homotypic) ή και διαφορετικών οροτύπων (heterotypic) [Kyriakopoulou *et al.*, (2010), Dedepsidis *et al.*, (2008), Kottaridi *et al.*, (2007), Wimmer E. *et al.*, (1993)].

Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν σε γενετικό ανασυνδυασμό:

4.2.1 Αντιγραφικός Μηχανισμός ή Μηχανισμός Αλλαγής Μήτρας(replicative)

Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό το εκμαγείο αλλάζει κατά τη διάρκεια της αντιγραφής δηλαδή η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου ξεκινά πάνω σε ένα

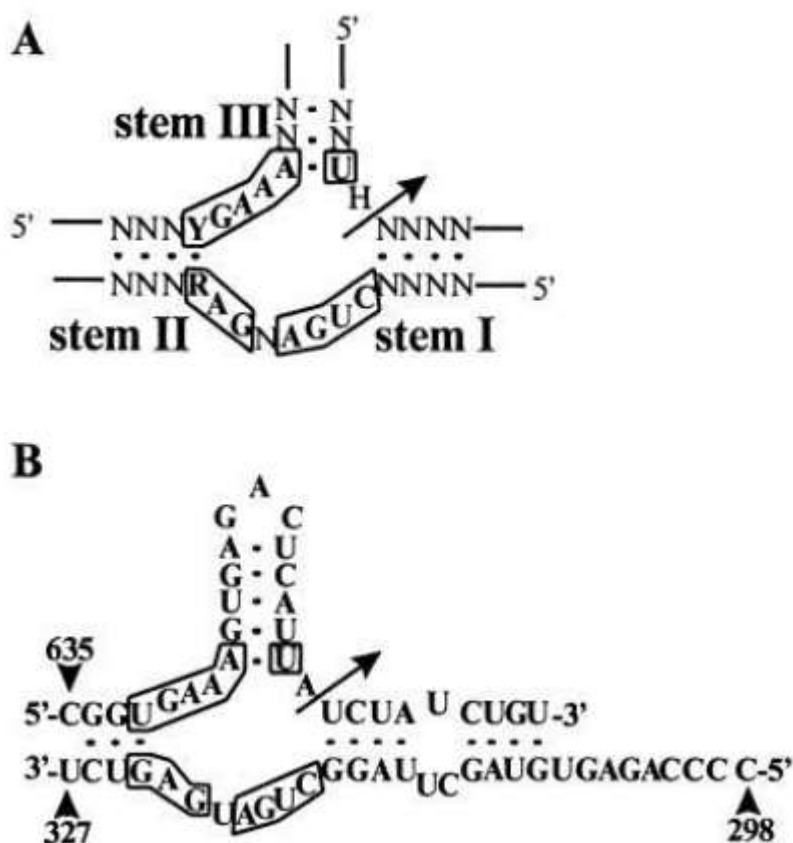
ικό RNA και ξαφνικά σταματά και συνεχίζει ξανά πάνω σε ένα άλλο ιικό RNA. Γι' αυτό το λόγο αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός και ως μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch). Η ιική 3D πολυμεράση χρησιμοποιεί για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας σαν καλούπι τον κλώνο θετικής πολικότητας του ιού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δίκλωνου μορίου RNA, γνωστό ως αντιγραφικό ενδιάμεσο. Ωστόσο κατά τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου η ιική πολυμεράση μπορεί να συναντήσει κάποιο εμπόδιο, με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή της μαζί με τον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο αρνητικής πολικότητας, από τον θετικής που χρησιμοποιείται σαν καλούπι, τη δέσμευσή τους σε περιοχές υψηλής ομολογίας ενός διαφορετικού κλώνου θετικής πολικότητας, που θα αποτελεί το νέο καλούπι και την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Το εμπόδιο μπορεί να αποτελεί είτε μία σταθερή δευτεροταγή RNA δομή [Romanova *et al.*, (1986)], είτε η προσθήκη λάθος νουκλεοτιδίου από την ιική πολυμεράση στον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο [Pilipenko *et al.*, (1995)]. Όταν η μετάβαση από το ένα στο άλλο εκμαγείο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος [Kirkegaard and Baltimore, (1986)]. Αντίθετα, μία μη ακριβής μετάβαση οδηγεί σε μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως π.χ. σε ελλείψεις και διπλασιασμούς. Αυτού του είδους ο ανασυνδυασμός είναι πιο πιθανός στις μη-κωδικές περιοχές του ιικού γενώματος. Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά την σύνθεση των (-) RNA κλώνων για δύο κυρίως λόγους. Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται σημαντικά από την διαθεσιμότητα των RNA μορίων που δρουν ως δέκτες και οι (+) RNA κλώνοι σε σύγκριση με τους (-) RNA κλώνους είναι πολύ περισσότεροι στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Επίσης οι (-) RNA κλώνοι βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία.



Εικόνα 4.2.1.1: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας για τον ανασυνδυασμό μεταξύ RNA γενωμάτων. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα δύο RNA μόρια. Οι αυτοσυμπληρωματικές περιοχές παριστάνονται ως *a* και *a'*. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο νεοσυντιθέμενο RNA μόριο [AgolV.I. (1997)]

4.2.2 Μηχανισμός Ρήξης και Επανένωσης

Ο μηχανισμός αυτός σε αντίθεση με τον προηγούμενο είναι μη αντιγραφικός και προϋποθέτει τη διάσπαση δύο ανασυνδυαζόμενων RNA μορίων σε κάποια σημεία και την ένωση του 5' άκρου του ενός με το 3' άκρο του άλλου μορίου. Σύμφωνα με έναν μηχανισμό, οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των δύο μορίων δέχονται επίθεση από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο μόριο H_2O , με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους και την έκθεση των 5' και 3' άκρων τους. Εν συνεχεία, τα 5' και 3' άκρα από διαφορετικά μόρια ενώνονται μέσω ενεργοποίησης της 5' φωσφορικής ομάδας. Σύμφωνα με έναν δεύτερο μηχανισμό, ένα φωσφοδιεστερικός δεσμός σε κάθε μόριο που πρόκειται να ανασυνδυαστεί δέχεται επίθεση από ένα παρακείμενο 2'-OH που παίζει το ρόλο του εσωτερικού νουκλεόφιλου. Το αποτέλεσμα είναι ένα κυκλικό μόριο που περιέχει ένα 2',3' φωσφοδιεστερικό ενδιάμεσο και ένα 5' άκρο που φέρει OH. Τέλος τα 5' και 3' άκρα από διαφορετικά μόρια ενώνονται μέσω μίας αντίδρασης τρανσεστεροποίησης [Gmyl *et al.*, (1999)].



Εικόνα:5.2.2.1:Μηχανισμός ανασυνδυασμού μέσω ρήξης και επανένωσης.Ένα μοντέλο που παρουσιάζει τη συμμετοχή μιας hammerhead-like ριβοενζυμικής δραστηριότητας. (Α) Φαίνονται τα συντηρημένα νουκλεοτίδια (εγκιβωτισμένα). Τα R, Y, και H αντιπροσωπεύουν μια πουρίνη, πυριμιδίνη, ή οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο εκτός G, αντίστοιχα. Η θέση διάσπασης φαίνεται με το βέλος. (Β) Μία υποθετική αναδίπλωση της 5' θέσης ενός μορίου δημιουργεί ένα hammerhead ριβοένζυμο που υβριδοποιείται με ένα τμήμα της 3' θέσης του άλλου μορίου [Gmyl *et al.*, (1999)].

Στόχος της Εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου εύκολου και ευαίσθητου, για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος των εντεροϊών, με σκοπό την αλληλούχιση του.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Στελέχη Εντεροϊών

Στο πειραματικό μέρος της πτυχιακής για τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη Sabin 1,2 και 3. Για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν 5 ανασυνδυασμένα στελέχη Sabin. Για την πραγματοποίηση της Real-Time PCR, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Sabin 1. Τα ανασυνδυασμένα στελέχη Sabin φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1.1: Παρουσιάζονται τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου, η πηγή προέλευσής τους, ο τύπος και η θέση ανασυνδυασμού τους καθώς και οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές τους.

Στελέχη	Πηγή	Τύπος Ανασυνδυασμού	Θέση Ανασυνδυασμού	Βιβλιογραφική Αναφορά
IK	Ουδετεροπενία	S3/S2	VP1, 3275-3285	Dedepisdís <i>et al.</i> , (2008)
415	VAPP	S3/S1	2C, 4878-4887	Paximadi <i>et al.</i> , (2006)
LK3	Περιβάλλον	S3/S2, S2/S1	2C, 4766-4791 2C, 4942-4958	Paximadi <i>et al.</i> , (2008)
738	Περιβάλλον	S3/S2, S2/S1	3C, 5804-5814 3D, 6901-6909	Pliaka <i>et al.</i> , (2010)
584	Περιβάλλον	S3/S2, S2/S1	2C, 4449-4464 3D, 7150-7172	Pliaka <i>et al.</i> , (2010)

τους.

Βάσει του WHO (World Health Organisation) τα δείγματα αυτά, όπως και όλα τα εμβολιοπροερχόμενα στελέχη πολιομυελίτιδας (Vaccine- derived poliovirus, VDPV), έπρεπε να καταστραφούν σε εργαστήρια που δεν πληρούν τις προϋποθέσεις εργαστηρίου Βιοασφάλειας 3, με το τέλος του έτους 2015. Στο εργαστήριο Μικροβιολογίας- Ιολογίας τα δείγματα καταστράφηκαν στις 16 Δεκεμβρίου 2015 και όλες οι PCR που περιγράφονται στη συνέχεια είχαν πραγματοποιηθεί πριν από αυτήν την ημερομηνία.

2. Υπολογισμός του TCID₅₀ των κλινικών δειγμάτων

Ο αριθμός των ιικών σωματιδίων που περιέχονται σε 100μl του ιικού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού. Ο ιικός τίτλος υπολογίστηκε για τα πέντε

δείγματα που απομονώθηκαν από τα κλινικά δείγματα. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των εντεροϊών ήταν η κυτταρική σειρά RD (κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος). Αρχικά έγιναν σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων, οι οποίες κυμάνθηκαν από 10^{-1} μέχρι 10^{-10} της αρχικής συγκέντρωσης. Οι σειριακές αραιώσεις έγιναν σε errendorf τα οποία περιείχαν ίσα ποσά θρεπτικού υλικού MEM-D (π.χ. στο πρώτο errendorf: 180μl MEM-D και 20μl κλινικού δείγματος, στο δεύτερο errendorf: 180μl MEM-D και 20μl από το περιεχόμενο του πρώτου errendorf κ.ο.κ). Κατόπιν το περιεχόμενο των errendorf ενοφθαλμίστηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης (εικόνα 2.1) οι οποίες περιείχαν κύτταρα RD ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D. Ο ενοφθαλμισμός της κάθε αραιώσης έγινε εις διπλούν ώστε να είναι αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (90μl από κάθε errendorf μεταφέρθηκαν στην πλάκα εις διπλούν). Στις στήλες 11 και 12 δεν προστέθηκε ιικό δείγμα καθώς αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Οι πλάκες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση χαρακτηριστικής κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE: cytopathic effect) λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα RD με θρεπτικό υλικό MEM-D).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
B	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
C	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
E	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
F	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
G	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
H	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M

Εικόνα 2.1 Απεικονίζεται μια πλάκα μικροτιτλοποίησης στην οποία έγινε ο ενοφθαλμισμός των σειριακών αραιώσεων των κλινικών δειγμάτων. Η κάθε πλάκα χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό 4 δειγμάτων (AB: το πρώτο δείγμα, CD: το δεύτερο δείγμα, EF: το τρίτο δείγμα, GH: το τέταρτο δείγμα). Οι αριθμοί μέσα στα πηγαδάκια απεικονίζουν τις σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων ενώ με το γράμμα M απεικονίζεται η θέση των μαρτύρων.

Στη συνέχεια το περιεχόμενο των πηγαδιών της πλάκας με τη μεγαλύτερη αραιώση που παρουσίασε CPE ενοφθαλμίστηκε σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών που περιείχαν κύτταρα RD ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό. Οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα RD μη μολυσμένα ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό). Τέλος, μετά την παρατήρηση CPE οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της εκχύλισης του γενετικού υλικού του ιού. Σκοπός των σειριακών αραιώσεων και του ενοφθαλμισμού των πλαστικών φιαλών κυτταροκαλλιιεργειών με την όσο δυνατόν μεγαλύτερη αραιώση είναι η αποφυγή μιγμάτων του ιού καθώς όπως αναφέρθηκε είναι χαρακτηριστικό των πολιοϊών η ύπαρξή τους ως quasi-species.

Η μέτρηση του ιικού τίτλου γίνεται με τον υπολογισμό της τιμής TCID₅₀. Το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί στην ποσότητα του ιού που είναι απαραίτητος για να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στο 50% των εμβολιασμένων κυττάρων μιας κυτταροκαλλιιεργείας. Το TCID₅₀ των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ίσο με 10⁵. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος είναι:

$$\log \text{CCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$$

CCID: Cell Culture Infective Dose

L: η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση.

3. Εκχύλιση του ιικού RNA

Το αρχικό βήμα ήταν η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA), που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas [Casas *et al.*, (1995)]. Συγκεκριμένα, μέσα σε erpendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml) και τέλος 100μl δείγματος από τη φιάλη κυτταροκαλλιιεργείας. Ακολούθησε vortex του

μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και πραγματοποιήθηκε ξανά vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 14000g και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε vortex για τη διαλυτοποίηση του ιζήματος και ξανά φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 14000g. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH₂O. Το RNA των δειγμάτων φυλάχθηκε στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

4. Αντίστροφη Μεταγραφή

Καθώς το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA, είναι αναγκαία προκειμένου να ακολουθήσει DOP-PCR και στη συνέχεια απλή PCR για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος των εντεροϊών, που είναι και ο στόχος της παρούσας εργασίας.

Αρχικά προετοιμάστηκε το μείγμα το οποίο περιείχε για την κάθε αντίδραση:

- 1μl Random Primers HEPTAN (N7) (100pmol/μl)
- 1 μl dNTPs (40 mM)
- 5 μl ddH₂O

Σε Eppendorfτων 500μl προστέθηκαν 7μl από το παραπάνω μείγμα και 5μl ιικού RNA από την εκχύλιση. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και επωάστηκαν στους 65°C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf. Μετά την επώαση τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο και προετοιμάστηκε το δεύτερο μείγμα, το οποίο περιείχε για την κάθε αντίδραση:

- 4μl First strand Buffer (5X)
- 2μl DTT (0,1mM)
- 0,5μl RNAase out (40U/μl)

- 0,5 μl M-MLV (Invitrogen) (200U/μl)
- 1μl ddH₂O

Αφού προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μείγματος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και επωάστηκαν διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 λεπτά στους 25 °C, 50 λεπτά στους 37 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

5. DOP (Degenerate oligonucleotide primed) –PCR

Η DOP-PCR σχεδιάστηκε για να ενισχύει μη ειδικά τον στόχο DNA, χωρίς περιορισμούς σχετικά με την πολυπλοκότητα του DNA ή τα είδη από τα οποία προήλθε. Στηρίζεται στην αρχή της υβριδοποίησης βραχείων αλληλουχιών που είναι ειδικές στο 3' άκρο, κατά τη διάρκεια των χαμηλών θερμοκρασιών κατά τους αρχικούς κύκλους του πρωτοκόλλου. Δεδομένου ότι αυτές οι βραχείες αλληλουχίες απαντώνται συχνά, η ενίσχυση του DNA στόχου εξελίσσεται σε πολλές θέσεις ταυτόχρονα [Telenius *et al.*, 1992]. Ο εκκινητής που χρησιμοποιείται στην DOP-PCR είναι μόνο ένας και είναι συνήθως 22bp και περιέχει ένα καλά καθορισμένο 3'-άκρο, το οποίο ακολουθείται από 6bp εκφυλισμένων νουκλεοτιδίων. Το 5'-άκρο περιέχει μια σπάνια θέση περιορισμού ενδονουκλεάσης.

Το πρωτόκολλο της DOP-PCR είναι ένας συνδυασμός δύο διαφορετικών προγραμμάτων κυκλοποίησης. Κατά τη διάρκεια των πρώτων πέντε κύκλων το δείγμα ενισχύεται υπό συνθήκες χαμηλής αυστηρότητας όπου υποβάλλεται σε διάφορες χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης και επιμήκυνσης ώστε να στοχεύσει διάφορες θέσεις πάνω στο γονιδίωμα και στη συνέχεια ακολουθούν 30 με 40 κύκλοι υψηλής αυστηρότητας όπου η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι υψηλότερη αυξάνοντας την εξειδίκευση της ενίσχυσης. Κατά τη διάρκεια των πρώτων πέντε κύκλων, μόνο το 3' άκρο των εκκινητών υβριδοποιείται και ξεκινά την επιμήκυνση από θέσεις που περιέχουν την καλά καθορισμένη ακολουθία των 6bp. Το εκφυλισμένο μέρος των εκκινητών βεβαιώνει ότι όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί των 12bp θα αναγνωριστούν και θα επιμηκυνθούν [Kiss *et al.*, (2002)].

Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη αντίδραση, σχεδιάστηκε σύμφωνα με τις παραπάνω προϋποθέσεις και είχε την παρακάτω αλληλουχία: 5'- **CCGACTCGAGINNNNNNTGTGG** -3' [McClenahan S. D. *et al.*,

(2013)].

Έχοντας ως στόχο την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την πραγματοποίηση της DOP-PCR, έγιναν δοκιμές διαφόρων πρωτοκόλλων. Αρχικά, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις dNTPs και KAPALong Buffer (0,4mM και 0,5mM και 1X και 5X, αντίστοιχα) και 200pmol εκκινητή DOP. Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν 35 και 40 κύκλοι στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης (σύμφωνα με τους κύκλους που επιλέχθηκαν και παρουσιάζονται παρακάτω στον πίνακα 5.2). Επιπλέον δοκιμάστηκε κι ένα διαφορετικό πρωτόκολλο στο οποίο η συγκέντρωση των dNTPs που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1mM, η συγκέντρωση του KAPALong Buffer 1X, η συγκέντρωση του DOP εκκινητή 500pmol και οι κύκλοι που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Πίνακας 5.1: Δοκιμαστικές συνθήκες για την πραγματοποίηση της DOP-PCR

1^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία αρχικής αποδιάταξης: 5 λεπτά στους 94°C
2^{ος}-6^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: 1 λεπτό στους 94°C -Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 1,5 λεπτά στους 30°C -Ramping: 0,1°C / s στους 30°C -Θερμοκρασία επέκτασης: 3 λεπτά στο 72°C
7^{ος} – 41^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: 1 λεπτό στους 94°C -Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 1 λεπτό στους 62°C -Θερμοκρασία επέκτασης: 2 λεπτά (+14 sec/cycle) στους 72°C
42^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία τελικής επέκτασης: 7 λεπτά στους 72°C

Ύστερα από έλεγχο των παραπάνω συνθηκών και συγκεντρώσεων επιλέχθηκαν ως βέλτιστες οι: 0,5mM συγκέντρωση dNTPs, 5X KAPALong Buffer, 200pmol εκκινητή DOP και οι συνθήκες της αντίδρασης που παρουσιάζονται στον πίνακα 5.2, καθώς παρουσίαζαν τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα.

Επιπροσθέτως, δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητα ακόμη δύο εκκινητικών μορίων: των IL-DOP με αλληλουχία 5'-GCT CTTCCGATCTINNNNNNTGTGG-3' [McClenahan S. D. *et al.*, (2013)] και DOP-PM 5'-CGACTCGAGVNNNNNNNTGTGG-3' ο οποίος σχεδιάστηκε στην παρούσα μελέτη. Μετά τη δοκιμή αυτών των εκκινητών με τις παραπάνω συνθήκες και συγκεντρώσεις, τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν με τη χρήση του DOP εκκινητή, καθώς οι υπό μελέτη ζώνες ήταν εντονότερες και τα παραπροϊόντα λιγότερα.

Η αντίδραση της DOP-PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl, με τη χρήση της υψηλής απόδοσης πολυμεράσης KAPA Long της εταιρίας KAPA. Αρχικά προετοιμάστηκε μείγμα που περιείχε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- 2,5μl dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 0,5mM)
- 12,5μl KAPALong Buffer (5X)
- 4μl MgCl₂ (25mM)
- 0,25μl ενζύμου KAPA Long πολυμεράσης (5U/μl)
- 2μl DOP εκκινητή (100pmol/μl)
- 18,75μl ddH₂O

Αφού μοιράστηκαν 40μl του παραπάνω μείγματος σε διαφορετικά μικροσωληνάρια, προστέθηκαν 10μl δείγματος σε κάθε ένα από αυτά. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή Techne-512, όπου υποβλήθηκαν στις εξής συνθήκες:

Πίνακας 5.2: Οι καλύτερες συνθήκες που επιλέχθηκαν για πραγματοποίηση της DOP-PCR

1^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία αρχικής αποδιάταξης: 5 λεπτά στους 94°C
2^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: 1 λεπτό στους 94°C -Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 5 λεπτά στους 25°C -Ramping: 0,1°C / s στους 30°C
3^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: 1 λεπτό στους 94°C -Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 4 λεπτά στους 30°C -Ramping: 0,1°C / s στους 30°C
4^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: 1 λεπτό στους 94°C -Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 3 λεπτά στους 37°C -Ramping: 0,1°C / s στους 42°C
5^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: 1 λεπτό στους 94°C -Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 2 λεπτά στους 42°C -Ramping με 0,1°C / s στους 55°C

6^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: 1 λεπτό στους 94°C -Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 1 λεπτό στους 55°C -Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 2 λεπτά στους 72°C
7^{ος} - 41^{ος}	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: 20 δευτερόλεπτα στους 94°C
κύκλος	-Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 1 λεπτό στους 55°C
(35 κύκλοι)	-Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 1 λεπτό στους 72°C + 1 δευτερόλεπτο/ κύκλο
42^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία τελικής επιμήκυνσης: 10 λεπτά στους 72°C

6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Όπως αναφέρθηκε η ενίσχυση που πραγματοποιείται με τη μέθοδο της DOP-PCR είναι μη ειδική. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν ξεχωριστές αντιδράσεις για την ενίσχυση των διαφόρων περιοχών του γονιδιώματος των εντεροϊών που θα σταλούν για αλληλούχιση.

Πραγματοποιήθηκαν 4 PCR που το μέγεθος των αλληλουχιών που ενισχύθηκαν ήταν μεγαλύτερο από 1kb και 2 PCR που το μέγεθος των αλληλουχιών ήταν μικρότερο σε μέγεθος, για να επιτευχθεί η αλληλό-επικάλυψη μεταξύ των εκκινητών στις διάφορες περιοχές. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, σύμφωνα με τη σειρά των θέσεων υβριδισμού τους στο γονιδίωμα των εντεροϊών:

Πίνακας 6.1: Η αλληλουχία, η θέση και τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην εκάστοτε PCR.

Όνομα	Sense/ Antisense	3'- Αλληλουχία -5'	Θέση	Περιοχή	Προϊόν (bp)
TS10	Sense	TACCCCTGTACGCCTGTTTT	70	5'UTR	750(bp)
HEV C-11	Antisense	CGCTGTCTTTGTAGTAGTTGAT	820	VP4	
SAB222S	Sense	ATCCGTTACCCGCTTGTGTA	222	5'UTR	2319(bp)
SAB2541A3	Antisense	TGTTGCTTCGGGAGTGAC	2541	VP1	

UG1	Sense	TTTGTGTCAGCGTGTTAATG	2399	VP3	473(bp)
UC1	Antisense	GAATTCCATGTCAAATCTAGA	2872	VP1	
S₃26	Sense	GCCGTAAGTTGGAGTTTTTCAC	2826	VP1	2392(bp)
S₂598	Antisense	TGATGTTCTCTCTGTTGAACC	5218	3B	
SAB5150S	Sense	ACGAGTCCCCCTCCTGAAT	5150	3 ^A	1298(bp)
SAB6448A	Antisense	CAGTGGGAGGTTGATTCCAT	6448	3D	
UG16	Sense	GTTGGTGGGAACGGTTCACA	5921	3C	1519(bp)
HEV C-425	Antisense	CTCCGAATTAAARRAAAATTAC	7440	3'UTR	

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 48 μl. Για τις αντιδράσεις με προϊόντα στις 2319 bp, 2392 bp, 1298 bp και 1519 bp χρησιμοποιήθηκαν:

- 6μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1,2mM),
- 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (TaqBuffer 10x)
- 1μl MgCl₂ 25mM
- 0,5 μl από τον κάθε εκκινητή (50pmol/μl),
- 1 Unit ενζύμου KAPA Taq DNA πολυμεράσης και
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 48μl.
- Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 2 μl προϊόντος της DOP-PCR, αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος.

Στις αντιδράσεις με τελικό προϊόν στις 750 bp και 473 bp χρησιμοποιήθηκαν:

- 5μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1mM),
- 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (TaqBuffer 10x)
- 1μl MgCl₂ 25mM
- 0,2μl από τον κάθε εκκινητή (50pmol/μl),
- 0,5 Unit ενζύμου KAPATaq DNA πολυμεράσης και
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 48μl.
- Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 2μl προϊόντος της DOP-PCR, αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν και τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

Πίνακας 6.2: Οι διάφορες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην εκάστοτε PCR

Ζεύγη Εκκινητών	Συνθήκες PCR	Αριθμός Κύκλων
TS1/HEV C-11	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 3min	1 κύκλος
	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec	40 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 45 °C για 30 sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 50 sec	
	Θερμοκρασία τελικής επιμήκυνσης: 72 °C για 2 min	1 κύκλος
SAB222S/ SAB2541A3	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 3min	1 κύκλος
	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec	50 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 42°C για 30 sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 3min	
	Θερμοκρασία τελικής επιμήκυνσης: 72 °C για 2 min	1 κύκλος
UG1/UC1	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 2min	1 κύκλος
	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec	30 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 43°C για 30 sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec	

	Θερμοκρασία τελικής επιμήκυνσης: 72 °C για 2 min	1 κύκλος
S₃26/S₂598	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 3min	1 κύκλος
	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec	50 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 45°C για 30 sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 3 min	
	Θερμοκρασία τελικής επιμήκυνσης: 72 °C για 2 min	1 κύκλος
SAB5150S/ SAB6448A	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 3min	1 κύκλος
	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec	50 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 45°C για 30 sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1 min 30 sec	
	Θερμοκρασία τελικής επιμήκυνσης: 72 °C για 2 min	1 κύκλος
UG16/ HEV C-425	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 3min	1 κύκλος
	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec	50 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 42°C για 30 sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 2 min	
	Θερμοκρασία τελικής επιμήκυνσης: 72 °C για 2 min	1 κύκλος

7. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πηκτή αгарόζης σε συγκέντρωση 1,5% για προϊόντα μεγαλύτερα των 1000 bp και 2% για προϊόντα μικρότερα των 1000 bp. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 0,6gr αгарόζης (InvitrogenUltra-PureGelAgarose) και 40mlTBE (Tris-Boricacid-EDTA) και στη δεύτερη 0,8gr αгарόζης και 60ml TBE. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αгарόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Με τη στερεοποίηση του πηκτώματος, 10 µl από κάθε PCR προϊόν αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης που περιέχει 50%

σουκρόζη και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Ως μάρτυρες μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκαν τα 100bp και 1kb Ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για περίπου 1 ώρα. Τέλος το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας UVFoto/Phoresissystem (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και φωτογραφίστηκε με Olympus digital camera.

8. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Εφόσον τα αποτελέσματα της PCR ήταν τα επιθυμητά, σύμφωνα με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, προχωρήσαμε στον καθαρισμό των προϊόντων της PCR. Συγκεκριμένα, τα υπόλοιπα 40 μl της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Οι επιθυμητές ζώνες αποκόπτονται από το πήκτωμα και τοποθετούνται σε eppendorf των 1,5 ml. Ακολουθεί ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με τη βοήθεια του Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

9. Αλληλούχιση των καθαρισμένων προϊόντων

Τα καθαρισμένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία Macrogen Europe (Amsterdam, The Netherlands). Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης των καθαρισμένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινητές οι αντίστοιχοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του κάθε προϊόντος. Στην περίπτωση των προϊόντων που το μέγεθος τους ήταν μεγαλύτερο της 1kb, η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε και από τις δύο κατευθύνσεις.

10. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αλληλουχιών και μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στελεχών εντεροϊών, στη βάση δεδομένων του NCBI, με τη βοήθεια του BLAST.

Το εργαλείο αυτό, το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), αποτελεί μια δημοφιλή μέθοδο εύρεσης

ομοιοτήτων νουκλεοτιδικών, αμινοξικών κ.α. αλληλουχιών. Ο αλγόριθμος BLAST πραγματοποιεί αναζήτηση στη διεθνή βάση δεδομένων ακολουθιών (GenBank) για αλληλουχίες ή τμήματα αλληλουχιών που παρουσιάζουν ομολογία με την αλληλουχία που μελετάμε. Χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της εγκυρότητας της τεχνικής που αναπτύχθηκε.

11. Real- Time PCR

Για να εξεταστεί η ίση κατανομή των τμημάτων που προκύπτουν από την προ-ενίσχυση του γονιδιώματος των εντεροϊών κατά την DOP-PCR πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR. Επιλέχθηκαν εκκινητές που υβριδοποιούνται σε 3 διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος (5'UTR, VP1 και 3D), ώστε να διευκρινιστεί εάν η ποσότητα του αρχικού μορίου στόχου είναι ίση. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Πίνακας 11.1: Η αλληλουχία, η θέση και τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην Real- Time PCR.

Όνομα	Sense/ Antisense	3'- Αλληλουχία -5'	Θέση	Περιοχή	Προϊόν (bp)
UG52	Sense	CAA GCACTTCTGTTTCCCCGG	168	5'UTR	423(bp)
UC53	Antisense	TTGTCACCATAACCAGCCA	606	5'UTR	
UG1	Sense	TTTGTGTCAGCGTGTTAATG	2399	VP3	473(bp)
UC1	Antisense	GAATTCCATGTCAAATCTAGA	2872	VP1	
UG16	Sense	GTTGGTGGGAACGGTTCACA	5921	3C	596(bp)
UC12	Antisense	TCAATTAGTCTGGATTTCCCTG	6516	3D	

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl, ειδικά για Real-Time PCR. Αρχικά προετοιμάστηκε ένα μείγμα και στα μικροσωληνάρια μοιράστηκαν 17μl από αυτό. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια:

- 0,4μl ROX Low (50X)

- 10μl KAPA SYBR FAST qPCR MasterMix (2X)
- 0,1μl από τον κάθε εκκινητή (5pmol/μl)
- ddH₂O 6,4 μl
- Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl προϊόντος της DOP-PCR

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν και τοποθετήθηκαν στο MX3005 της STRATAGENE στις εξής συνθήκες:

Πίνακας 11.2: Συνθήκες πραγματοποίηση της Real-Time PCR

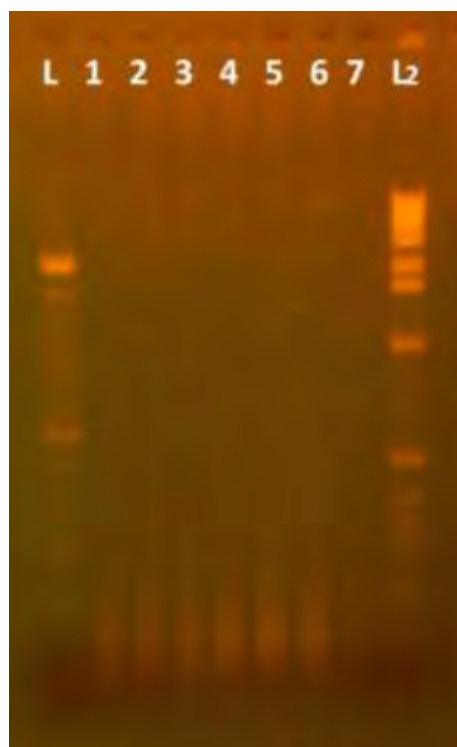
1^{ος} κύκλος	-Θερμοκρασία αρχικής αποδιάταξης: <u>1 λεπτό στους 95°C</u>
40 κύκλοι	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: <u>3 δευτερόλεπτα στους 94°C</u> -Θερμοκρασία υβριδοποίησης: <u>20 δευτερόλεπτα στους 43°C</u> -Θερμοκρασία επέκτασης: <u>1 δευτερόλεπτο στο 72°C</u>
1^{ος} κύκλος	-Melting Curve Analysis <u>55°C-95°C</u>

Αποτελέσματα

1. Αποτελέσματα PCR

A. DOP-PCR

Όπως ήδη αναφέρθηκε, αρχικά πραγματοποιήθηκε η DOP-PCR για την προ-ενίσχυση, μη ειδικά, ολόκληρου του γονιδιώματος των εντεροϊών. Μετά την ηλεκτροφόρηση προέκυψε η παρακάτω εικόνα. Κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε DOP-PCR προκύπτει ένα νέφος (smear). Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δις αποσταγμένο νερό για να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία και διεξαγωγή της PCR.

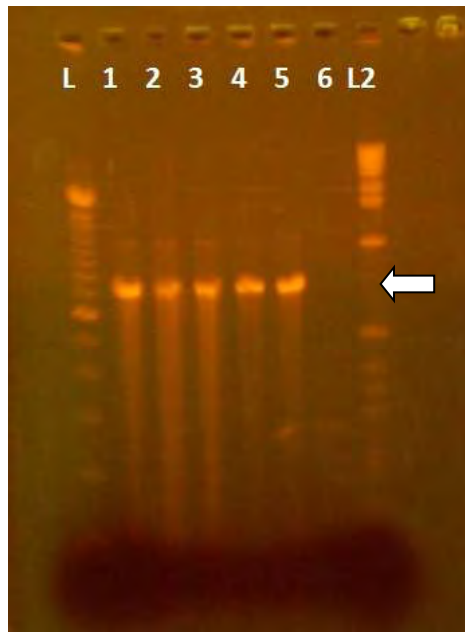


L	Ladder 100bp
1	IK
2	415
3	LK3
4	Δε Χρησιμοποιείται
5	738
6	584
7	ddH ₂ O
L2	Ladder 1kb

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών για την ειδική ενίσχυση των διαφόρων περιοχών του γονιδιώματος των εντεροϊών και τα αποτελέσματα είναι τα παρακάτω.

B.TS1/ HEVC-11

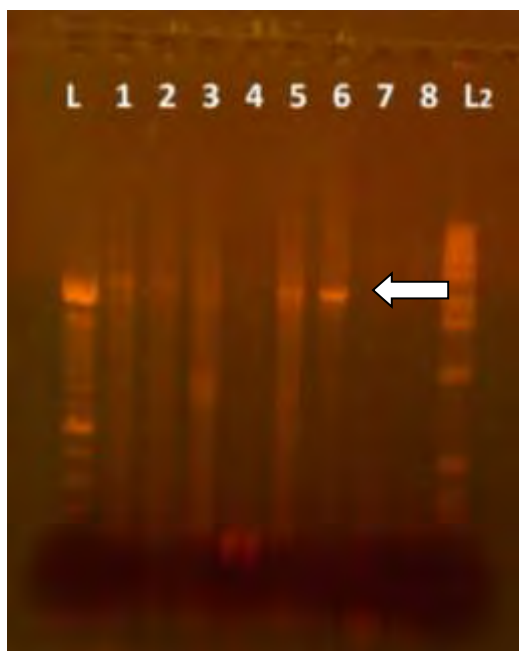
Το προϊόν αυτής της PCR είναι στις 750bp και η ενίσχυση αφορά στην 5'UTR.



L	Ladder 100bp
1	IK
2	415
3	LK3
4	738
5	584
6	ddH ₂ O
L2	Ladder 1kb

Γ.SAB222S/ SAB2541A3

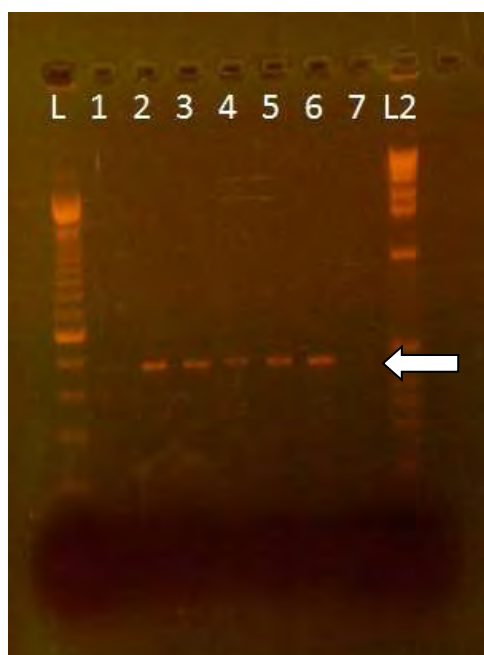
Το προϊόν αυτής της PCR είναι στις 2319bp και η ενίσχυση αφορά από την 5'UTR έως την VP1 περιοχή. Όλα τα δείγματα εμφάνισαν το αναμενόμενο προϊόν.



L	Ladder 100bp
1	IK
2	415
3	LK3
4	Δε χρησιμοποιείται
5	738
6	584
7	ddH ₂ O (από DOP-PCR)
8	ddH ₂ O
L2	Ladder 1kb

Δ.UG1/UC1

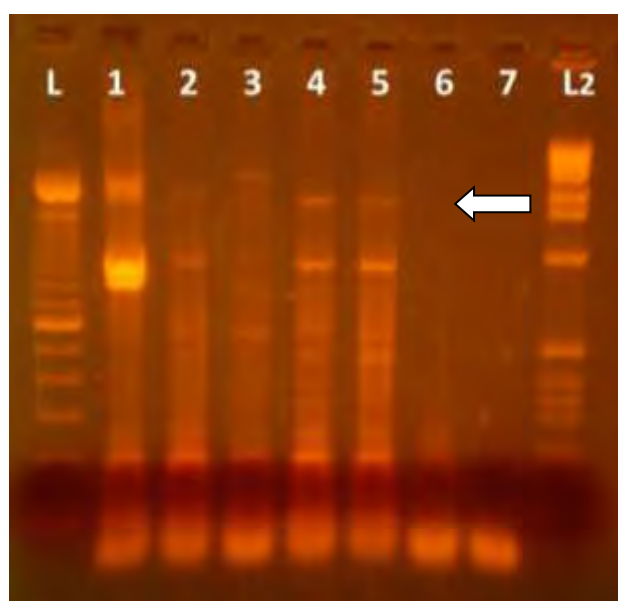
Αυτή η PCRπραγματοποιήθηκε για να επιτευχθεί η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ του προηγούμενου και του επόμενου ζεύγους εκκινητών. Το προϊόν αυτής της PCR είναι στις 473bp και η ενίσχυση από την VP3 έως την VP1.



L	Ladder 100bp
1	IK
2	415
3	LK3
4	Δε χρησιμοποιείται
5	738
6	584
7	ddH ₂ O
L2	Ladder 1kb

E.S₃26/ S₂598

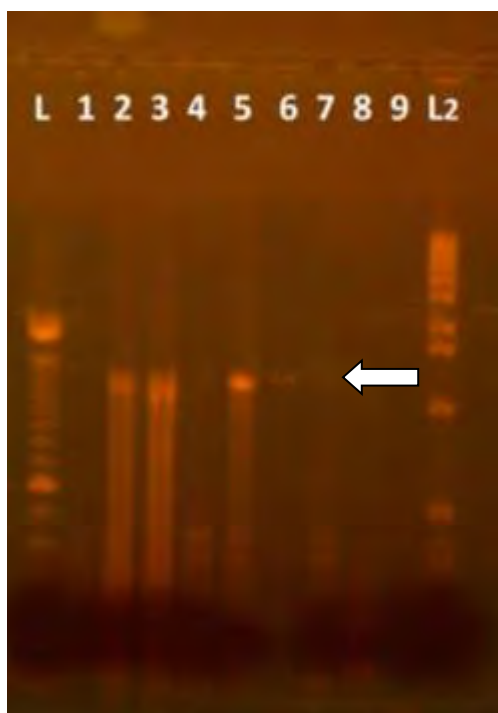
Το προϊόν αυτής της PCRείναι στις 2392bp και η ενίσχυση από την VP1 έως την 3B περιοχή. Στο δείγμα LK3 (θέση 3) δεν παρατηρήθηκε προϊόν στο αναμενόμενο ύψος. Η έλλειψη προϊόντος ίσως να οφείλεται στην έλλειψη επαρκούς συμπληρωματικότητας μεταξύ του δείγματος και του ζεύγους εκκινητών.



L	Ladder 100bp
1	IK
2	415
3	LK3
4	738
5	584
6	ddH ₂ O (από DOP-PCR)
7	ddH ₂ O
L2	Ladder 1kb

ΣΤ. SAB5150S/ SAB6448A

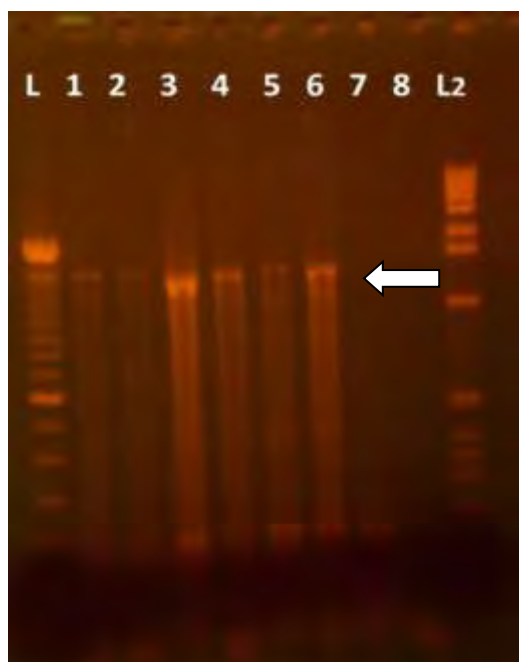
Το προϊόν αυτής της PCR είναι στις 1298bp και η ενίσχυση από την 3A έως την 3D περιοχή. Στο δείγμα IK (θέση 1) δεν παρατηρήθηκε προϊόν στο αναμενόμενο ύψος. Η έλλειψη προϊόντος ίσως να οφείλεται στην έλλειψη επαρκούς συμπληρωματικότητας μεταξύ του δείγματος και του ζεύγους εκκινητών.



L	Ladder 100bp
1	IK
2	415
3	LK3
4	Δε Χρησιμοποιείται
5	738
6	584
7	ddH ₂ O (από DOP-PCR)
8	ddH ₂ O
9	Κενό
L2	Ladder 1kb

Ζ.UG16/HEVC-425

Το προϊόν αυτής της PCR είναι στις 1519bp και η ενίσχυση από την 3C έως την 3'UTR περιοχή.



L	Ladder 100bp
1	IK
2	415
3	LK3
4	Δε Χρησιμοποιείται
5	738
6	584
7	ddH ₂ O (από DOP-PCR)
8	ddH ₂ O
L2	Ladder 1kb

2. Αποτελέσματα Αλληλούχησης - BLAST

Όπως αναφέρθηκε, τα προϊόντα που προέκυψαν από τις διάφορες PCR καθαρίστηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχηση στην εταιρεία MacroGene Europe (Amsterdam, The Netherlands), έτσι ώστε να διαπιστωθεί η εξειδίκευση της τεχνικής. Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αλληλουχιών και με ομοπαράθεση μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με τις αλληλουχίες των αντίστοιχων στελεχών εντεροϊών που έχουν κατατεθεί, με τη βοήθεια του BLAST.

Όλες οι αλληλουχίες αντιστοιχούσαν στο κάθε στέλεχος από το οποίο προέρχονταν, καθώς και στις αναμενόμενες περιοχές του γονιδιώματος που πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση. Αυτά τα αποτελέσματα επαλήθευσαν την εξειδίκευση της τεχνικής.

Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά 3 δείγματα και τα αποτελέσματα του BLAST.

Για το δείγμα LK3 με το ζεύγος εκκινητών SAB222S/SAB2541A3 και προϊόν 2319bp, το αποτέλεσμα της ομοπαράθεσης ήταν:

Περιγραφή	Max score	Total score	Cover	e-value	Ident	Accession
Human poliovirus 3 strain NIE1118535, complete genome	1339	1339	91%	0.0	98%	KJ170675.1

Για το δείγμα 738 με το ζεύγος SAB5150S/SAB6448A και προϊόν 1298bp, το αποτέλεσμα της ομοπαράθεσης ήταν:

Περιγραφή	Max score	Total score	Cover	e-value	Ident	Accession
Human poliovirus 3 strain vaccine isolate V13 polyprotein gene, partial cds; and 3' UTR	1432	1432	99%	0.0	99%	EU598487.1

Για το δείγμα 415 με το ζεύγος UG16/HEV C-425 και προϊόν 1519bp, το αποτέλεσμα της ομοπαράθεσης ήταν:

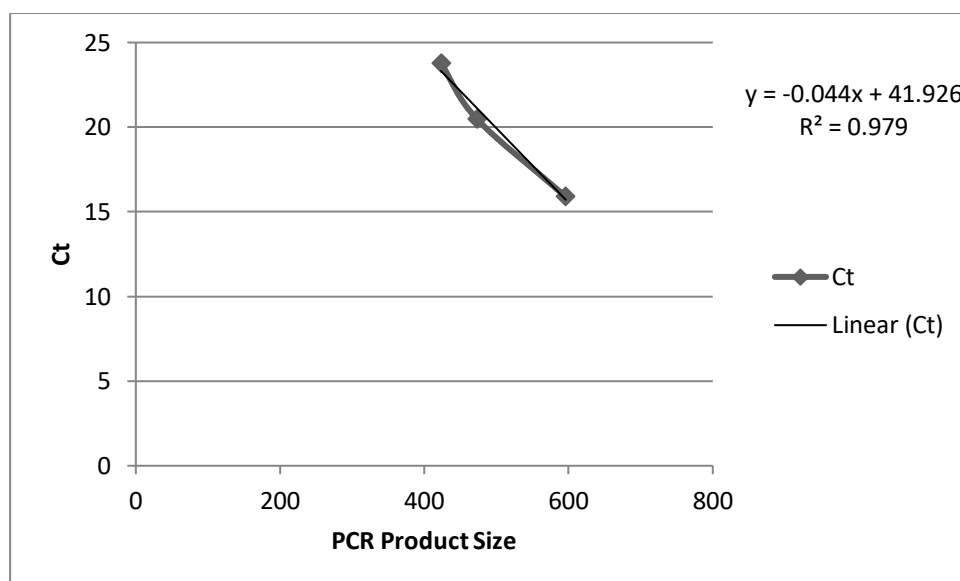
Περιγραφή	Max score	Total score	Cover	e-value	Ident	Accession
Human poliovirus 1 strain Sabin isolate EP23 polyprotein gene, partial cds	830	830	95%	0.0	99%	AY736181.1

3. Αποτελέσματα Real-Time PCR

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR για να διαπιστωθεί η ίση κατανομή των τμημάτων που προκύπτουν από την προ-ενίσχυση στις περιοχές του γονιδιώματος. Ως Ct (Cycle Threshold) ορίζεται ο κύκλος στον οποίο θετικοποιείται η τιμή του φθορισμού. Κατά συνέπεια η αρχική ποσότητα του μορίου στόχου σχετίζεται με το Ct. Ίσες ποσότητες αρχικού μορίου στόχου αναμένεται να δώσουν ίδιες τιμές Ct.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη Real-Time στις τρεις γενωμικές περιοχές (5'UTR, VP1,3D) είναι τα παρακάτω:

PCR Product (bp)	Ct
423	24
473	21
596	16



Εικόνα 3.1: Συσχέτιση μεταξύ του μήκους των προϊόντων της PCR και του Ct. Στον άξονα των y απεικονίζονται οι τιμές του Ct και στον άξονα των x τα μήκη των τριών προϊόντων σε bp.

Παρατηρούμε ότι και οι 3 τιμές που προκύπτουν μπορούν να τοποθετηθούν σε μία ευθεία και ότι ο συντελεστής συσχέτισης R^2 είναι πολύ κοντά στην τιμή 1 ($R^2 \approx 0,99$). Η διαφορά που παρατηρείται στο Ct του τρίτου προϊόντος σε σχέση με τα υπόλοιπα δύο, οφείλεται στο διαφορετικό μέγεθος του προϊόντος αυτού σε σύγκριση με τα δύο προηγούμενα.

Αναμένουμε δηλαδή η διαφορά στο Ct να είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους του προϊόντος. Οι αναμενόμενες τιμές Ct προκύπτουν πολλαπλασιάζοντας το λόγο των προϊόντων με το Ct του μεγαλύτερου προϊόντος.

Για τη ζώνη των 423bp προκύπτει μία αναμενόμενη τιμή Ct:

$$\frac{596}{423} \times 16 = 1,4 \times 16 = 22,4$$

Ενώ για τη ζώνη των 473bp προκύπτει:

$$\frac{596}{473} \times 16 = 1,26 \times 16 = 20,16$$

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται όλα τα παραπάνω και επιπλέον εμφανίζεται η ποσοστιαία διαφορά μεταξύ αναμενόμενης και παρατηρούμενης τιμή Ct, η οποία και στα δύο προϊόντα (423bp, 473bp) είναι κάτω του 10% και υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά.

PCR Product (bp)	Παρατηρούμενο Ct	Αναμενόμενο Ct	Διαφορά
423	24	22,4	6%
473	21	20,16	4,3%
596	16	-	-

Συζήτηση

Το γένος των εντεροϊών ανήκει στην οικογένεια ιών Picornaviridae. Τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι μη ελутροφόροι ιοί και το γένωμα τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας κι έχει μήκος περίπου 7500 νουκλεοτίδια.

Οι εντεροϊοί προκαλούν ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, από ασυμπτωματικές λοιμώξεις μέχρι πιο σοβαρές ασθένειες, όπως άσηπτη μηνιγγίτιδα, μυοκαρδίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση. Οι εντεροϊοί, καθώς και όλοι οι RNA ιοί, έχουν μικρά, απλά γονιδιώματα τα οποία έχουν υψηλό βαθμό ποικιλότητας, λόγω της χαμηλής πιστότητας ιικής πολυμεράσης που χρησιμοποιούν για την αντιγραφή τους, δημιουργώντας πολλά προβλήματα στην προσπάθεια ανάπτυξης τεχνικών για την αλληλούχισή τους [Marston *et al.*, (2013)].

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στρατηγική για την υψηλής απόδοσης αλληλούχηση των RNAίων, περιλαμβάνει το σχεδιασμό αλληλοεπικαλυπτόμενων αμπλικονίων, τα οποία εκτείνονται σε ολόκληρο το γονιδίωμα του ιού, ακολουθούμενα από τη στοχευμένη ενίσχυση γενομικών περιοχών περίπου 1000bp, από αντίστροφη μεταγραφή σε πλάκες 96 θέσεων. Παρόλο που αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για RNA όσο και για DNAιούς, καθώς και σε περιπτώσεις μικρής ποσότητας ιικών νουκλεϊκών οξέων, δεν είναι χρήσιμη για την απόκτηση γενωμικών πληροφοριών από ιούς για τους οποίους υπάρχουν λίγες ή καθόλου διαθέσιμες πληροφορίες των αλληλουχιών τους ή για ιούς οι οποίοι έχουν αποκλίνει σημαντικά από στελέχη με δημοσιευμένες αλληλουχίες [Djikeng and Spiro, (2009)].

Η διαδικασία της αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) έχει καταστεί μία πολύ ισχυρή προσέγγιση στο πεδίο των μολυσματικών ασθενειών και έχει επιφέρει την επανάσταση στις μελέτες της μοριακής ιολογίας. Η NGSείναι χρήσιμη για την αλληλούχηση των ιών. Μέσω αυτής καθίσταται δυνατή η ανίχνευση της μόλυνσης πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων, κάτι που επιφέρει σημαντικές συνέπειες στην πρόληψη και στην παροχή υγειονομικής περίθαλψης. Η NGSέχει εφαρμοστεί εκτενώς σε ευρύ φάσμα ανίχνευσης, για την παρακολούθηση της εξάπλωσης των παθογόνων παγκοσμίως [Chan *et al.*, (2012)], σε επιδημιολογικές μελέτες παγκοσμίως, για την ανάλυση της

ποικιλομορφίας ιικών κοινοτήτων σε μεταγενωμικές αναλύσεις [Sibley *et al.*, (2012)], καθώς και για την ανίχνευση άγνωστων παθογόνων και την ανακάλυψη νέων ιών [Barzon *et al.*, (2011)]. Τρεις τεχνολογίες είναι αυτές που χρησιμοποιούνται περισσότερο: η Roche/454 technology (Roche applied sciences, Basel, Switzerland), η Illumina/Solexa technology (Illumina Inc., San Diego, CA) και η Life Technology (Applied Biosystems, Foster City, CA). Και οι 3 περιλαμβάνουν την επεξεργασία του δείγματος, την αλληλούχιση και την απόκτηση των δεδομένων, αλλά διαφέρουν σε αυτές τις διαδικασίες. Γι αυτό το λόγο κάθε μία από αυτές τις τεχνολογίες έχει τις δικές της ιδιαιτερότητες στο μήκος της αλληλούχισης, στο χρόνο, στην ακρίβεια, στα ποσοστά σφάλματος, στο κόστος του εξοπλισμού καθώς και στο κόστος του δείγματος [Glenn (2011), Beerenwinkel *et al.*, (2012)].

Στην παρούσα εργασία έγινε μία προσπάθεια ανάπτυξης μίας γρήγορης και εύκολης ενίσχυσης ολόκληρου του γονιδιώματος των εντεροϊών. Το γονιδίωμα καλύπτεται με λίγες μόνο αντιδράσεις ενίσχυσης και τα τμήματα, στη συνέχεια μπορούν να αλληλουχηθούν. Η τεχνική αυτή είναι ανεξάρτητη προηγούμενης αλληλούχισης, καθώς δε χρειάζεται να είναι γνωστή από πριν η αλληλουχία του γονιδιώματος των στελεχών και μπορεί να ενισχύσει γονιδιώματα εντεροϊών εξαιρετικά χαμηλών αντιγράφων [Dupinay *et al.*, (2012)]. Το πρώτο βήμα περιελάμβανε τη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου προενίσχυσης του γονιδιώματος των εντεροϊών. Βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για τη χρήση της DOP-PCR κατά την οποία πραγματοποιείται μία μη ειδική προενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος των εντεροϊών. Αυτό είναι δυνατό, χάρη στη χρήση ενός μόνο εκφυλισμένου εκκινητή 22 περίπου βάσεων (και όχι ζεύγους εκκινητών), ο οποίος περιέχει μία καλά καθορισμένη αλληλουχία στο 3'- άκρο, η οποία ακολουθείται από 6bp εκφυλισμένων νουκλεοτιδίων. Το 5'-άκρο περιέχει μια σπάνια θέση περιορισμού ενδονουκλεάσης [Telenius *et al.*, (1992)]. Η αλληλουχία του εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η εξής 5'- CCGACTCGAGINNNNNNTGTGG -3' [McClenahan *et al.*, (2013)].

Κατά την DOP-PCR πραγματοποιήθηκαν πέντε πρώτοι κύκλοι, όπου το δείγμα ενισχύθηκε υπό συνθήκες χαμηλής αυστηρότητας καθώς υποβάλλεται σε διάφορες χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης και επιμήκυνσης ώστε να στοχεύσει διάφορες θέσεις πάνω στο γονιδίωμα. Αυτούς τους πέντε κύκλους ακολούθησαν 30

με 40 κύκλοι υψηλής αυστηρότητας, όπου η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι υψηλότερη αυξάνοντας την εξειδίκευση της ενίσχυσης. Κατά τη διάρκεια των πρώτων πέντε κύκλων, μόνο το 3' άκρο των εκκινητών υβριδοποιείται και ξεκινά την επιμήκυνση από θέσεις που περιέχουν την καλά καθορισμένη ακολουθία των 6bp. Το εκφυλισμένο μέρος των εκκινητών βεβαιώνει ότι όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί των 12bp θα αναγνωριστούν και θα επιμηκυνθούν. Η τεχνική αρχικά χρησιμοποιήθηκε και δοκιμάστηκε στα πρότυπα στελέχη των Sabin 1,2 και 3, ώστε να βρεθούν οι καλύτερες συνθήκες ενίσχυσης και το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η KAPALong πολυμεράση της εταιρίας KAPA, που είναι υψηλής πιστότητας.

Η ενίσχυση που επιτυγχάνεται με τη χρήση της DOP-PCR είναι μη ειδική, γι' αυτό τα λόγιο πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές PCR με αλληλεπικαλυπτόμενα ζεύγη εκκινητών, με στόχο την ειδική ενίσχυση των διαφόρων περιοχών του γονιδιώματος των εντεροϊών ώστε να σταλούν για αλληλούχιση.

Με την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών, χρησιμοποιήθηκαν τα ανασυνδυασμένα στελέχη Sabin (όπως περιγράφηκαν στον πίνακα 1.1) προκειμένου να ελεγχθεί η αξιοπιστία της τεχνικής.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος *TS1/HEVC-11*. Οι εκκινητές αυτοί στοχεύουν στην 5'UTR περιοχή του γονιδιώματος και πρώτος είναι γενικός για όλους τους εντεροϊούς (universal), ενώ ο δεύτερος είναι γενικός μόνο για τους εντεροϊούς της ομάδας C. Αυτό το ζεύγος χρησιμοποιήθηκε για να καλύψει το κενό ενίσχυσης που υπήρχε στις πρώτες 200 βάσεις του γονιδιώματος.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών *SAB222S/SAB541A3* το οποίο ενισχύει μια περιοχή 2319 βάσεων από την 5'UTR έως την VP1 περιοχή. Οι εκκινητές αυτοί δεν είναι universal και σχεδιάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Ο πρώτος είναι γενικός για όλα τα στελέχη Sabin, ενώ ο δεύτερος είναι ειδικός για τα στελέχη Sabin 3. Καθώς όλα τα ανασυνδυασμένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούν σε Sabin 3 στην περιοχή αυτή, το αναμενόμενο προϊόν προέκυψε από όλα τα δείγματα. Παρατηρείται διαφορετική ένταση των ζωνών μεταξύ των διαφόρων προϊόντων στο πήκτωμα μετά την ηλεκτροφόρηση, η οποία είναι πιθανό να σχετίζεται με την καλύτερη συμπληρωματικότητα των εκκινητών στα δείγματα. Ωστόσο, αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα καθώς η ενίσχυση πραγματοποιείται το ίδιο αποτελεσματικά ακόμη και στο δείγμα LK3 που η ζώνη είναι πολύ αχνή, κάτι που

εξακριβώθηκε από την αλληλούχιση των προϊόντων που ακολούθησε.

Το ζεύγος *UG1/UC1* που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια, ενισχύει μία μικρή περιοχή 473 βάσεων από τη VP3 έως τη VP1 περιοχή προκειμένου να καλύψει το κενό ανάμεσα στο προηγούμενο και επόμενο ζεύγος εκκινητών. Οι εκκινητές αυτοί είναι Universal.

Το μεγαλύτερο κομμάτι που ενισχύθηκε ήταν 2392 bp και προέκυψε από το ζεύγος εκκινητών *S₃26/S₂598*. Οι εκκινητές αυτοί πραγματοποιούν μία ενίσχυση από την VP1 έως την 3Bπεριοχή. Δεν αποτελούν Universal εκκινητές και σχεδιάστηκαν σε μία προηγούμενη μελέτη. Ο πρώτος εκκινητής είναι ειδικός για Sabin 3 στελέχη και ο δεύτερος για Sabin 2, στις περιοχές που υβριδοποιούνται. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι ο δεύτερος ενισχύει την αντίστοιχη περιοχή και στα Sabin 1 στελέχη, γεγονός που αιτιολογεί την ύπαρξη προϊόντος στο δείγμα IK, το οποίο στην περιοχή υβριδοποίησης του συγκεκριμένου εκκινητή είναι Sabin 1. Έτσι, μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, προκύπτει προϊόν στο αναμενόμενο ύψος στα 4 από τα 5 δείγματα σε αυτήν την περιοχή. Η έλλειψη προϊόντος στο δείγμα LK3 ίσως να οφείλεται στην έλλειψη επαρκούς συμπληρωματικότητας μεταξύ του δείγματος και του ζεύγους εκκινητών.

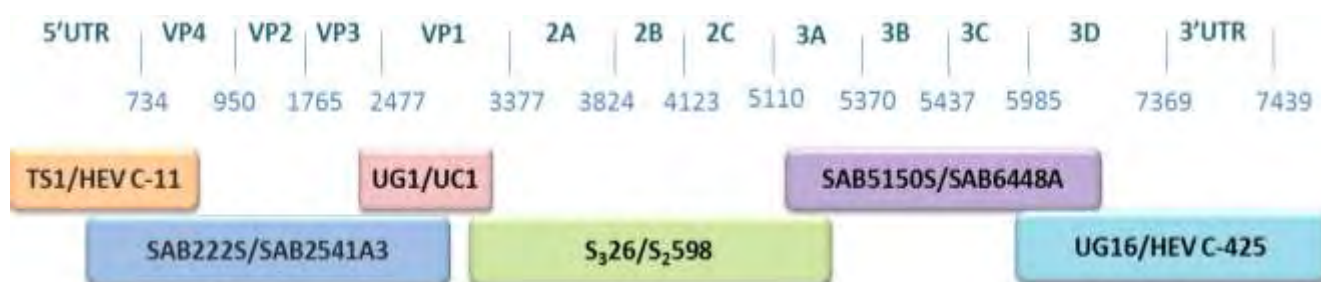
Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση από την 3A έως την 3D περιοχή του γονιδιώματος των στελεχών από το ζεύγος εκκινητών *SAB5150S/SAB6448A*, το οποίο επίσης δεν είναι Universal, ωστόσο είναι γενικό για όλα τα στελέχη Sabin και σχεδιάστηκε στη παρούσα μελέτη. Εκτός από το δείγμα IK, προϊόν προέκυψε από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Η έλλειψη προϊόντος στο δείγμα IK δεν οφείλεται σε πρόβλημα της τεχνικής, αλλά σε έλλειψη επαρκούς συμπληρωματικότητας μεταξύ του δείγματος και του ζεύγους εκκινητών.

Η τελευταία ενίσχυση πραγματοποιήθηκε από το ζεύγος εκκινητών *UG16/HEVC-425*, από την 3C έως την 3'UTR περιοχή των στελεχών. Ο πρώτος εκκινητής είναι γενικός για όλους τους εντεροϊούς, ενώ ο δεύτερος είναι ειδικός για την ομάδα C των ανθρώπινων εντεροϊών, στους οποίους ανήκουν τα Sabin στελέχη. Η ενίσχυση που πραγματοποιήθηκε ήταν 1519 βάσεων και το αναμενόμενο προϊόν προέκυψε από όλα τα στελέχη.

Η ύπαρξη των παραπροϊόντων και του νέφους στα αποτελέσματα της κάθε PCR, οφείλεται στην προ-ενίσχυση του γονιδιώματος από την DOP-PCR και δεν

επηρεάζουν το ειδικό προϊόν και τα αποτελέσματα γενικότερα. Επιπλέον, η διαφορετική ένταση των προϊόντων είναι πιθανό να οφείλεται σε διαφορετική συμπληρωματικότητα των εκκινητών με το εκάστοτε δείγμα και δε συνδέεται με την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Η αλληλούχιση των προϊόντων από κάθε PCR επιβεβαίωσε την εγκυρότητα της τεχνικής, καθώς ακόμη και σε δείγματα που οι ζώνες στο πήκτωμα ήταν αρκετά αχνές, η αλληλούχιση ήταν επιτυχής.

Τέλος πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR για να εξεταστεί η ίση κατανομή των τμημάτων που προκύπτουν από την προ-ενίσχυση του γονιδιώματος των εντεροϊών κατά την DOP-PCR. Ο έλεγχος έγινε σε τρεις περιοχές του γονιδιώματος (5'UTR, VP1 και 3D) με τα ζεύγη εκκινητών (UG52/UC53, UG1/UC1 και UG16/UC12, αντίστοιχα). Αν και παρατηρήθηκαν διαφορετικές τιμές Ct συνυπολογίστηκε το διαφορετικό μήκος των προϊόντων και παρατηρήθηκε ότι οι διαφορετικές τιμές Ct ήταν αναμενόμενες. Κατά συνέπεια δεν εντοπίστηκε διαφορά στις τρεις γενωμικές περιοχές καθώς η διαφορά που παρατηρήθηκε (4,3 - 6%) ήταν μικρότερη του 10%.



Εικόνα: Οι εκκινητές και οι αντίστοιχες περιοχές ενίσχυσής τους. Απεικονίζονται οι περιοχές, του γονιδιώματος, τα όρια της κάθε περιοχής καθώς και το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυσή τους.

Συνοψίζοντας, αναπτύχθηκε μία τεχνική με την οποία έγινε δυνατή η ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος των εντεροϊών με σχεδόν μόνο 4 αντιδράσεις. Η μεγαλύτερη ενίσχυση που επιτεύχθηκε ήταν 2392bp, κάτι που είναι αδύνατο να πραγματοποιηθεί με μία απλή PCR, όπου η Taq πολυμεράση δεν είναι τύπου LONG RANGE Taq καθώς το μεγαλύτερο κομμάτι που μπορεί να ενισχύσει είναι περίπου 1000-2000bp. Επιπλέον όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε εγκαταστάσεις με απλό εξοπλισμό, χαμηλότερου κόστους από αυτόν που χρησιμοποιείται στην NGS, υποδεικνύοντας τη χρήση της τεχνικής σε εργαστήρια που δε διαθέτουν υπερσύγχρονα μηχανήματα. Οι περισσότερες αντιδράσεις έγιναν

με τη χρήση απλής DNA πολυμεράσης, υποδεικνύοντας και το χαμηλό κόστος της τεχνικής, ως προς τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίησή της.

Τα δείγματα της παρούσας εργασίας προέρχονταν μόνο από κυτταροκαλλιέργειες. Συνεπώς, θα ήταν απαραίτητος ο έλεγχος της τεχνικής και σε δείγματα που προέρχονται από εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή ακόμη και λύματα, για να μπορούμε να αναφερόμαστε σε αυτήν ως μία τεχνική καθολική για τους εντεροϊούς.

Η αλληλούχιση χρησιμοποιείται ευρύτατα τόσο σε επιδημιολογικές μελέτες, όσο και ως διαγνωστικό εργαλείο. Η ύπαρξη μίας τεχνικής γρήγορης, εύκολης και οικονομικής, που είναι ικανή να ενισχύσει πολύ μικρές ποσότητες αντιγράφων ιικών νουκλεϊκών οξέων είναι πολύ χρήσιμη τόσο για την κατάταξη νέων στελεχών που μπορεί να προκύπτουν μέσω εξέλιξης όσο και για την ταυτοποίηση των μηχανισμών εξέλιξής τους.

Βιβλιογραφία

Adams, M.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **2013**;158: 2023–2030.

Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **2014**;159: 2831-2841.

Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Bamford, D.H., Breitbart, M., Davison, A.J., Ghabrial, S.A., Gorbalenya, A.E., Knowles, N.J., Krell, P., Lavigne, R., Prangishvili, D., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P. and Carstens, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **2015**;160: 1837-1850.

Ambros V, Baltimore D. Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem* **1980**;255:6739–6744.

Ambros V, Pettersson RF, Baltimore D. An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell* **1978**;15:1439–1446.

Andino R., G. E. Rieckhof, P. L. Achacoso, and D. Baltimore. Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNA complex formed around the 5'-end of viral RNA. *The EMBO Journal* **1993**;12(9): 3587-3598.

Ansardi DC, Luo M, Morrow CD. Mutations in the poliovirus P1 capsid precursor at arginine residues VP4-ARG34, VP3-ARG223, and VP1-ARG129 affect virus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Virology* **1994**;199: 20-34.

Saskia E. Bakker E. S., Groppelli E., Pearson A. R., Stockley P.G., Rowlands D. J. and Ranson N.A. Limits of Structural Plasticity in a Picornavirus Capsid Revealed by a Massively Expanded Equine Rhinitis A Virus Particle. *J. Virol.* **2014**;88(11): 6093-6099.

Barzon L, Lavezzo E., Militello V. , Toppo S. and Palù G. Applications of Next-Generation Sequencing Technologies to Diagnostic Virology. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**;12: 7861-7884

Beerenwinkel N., Gunthard H. F., Roth V. and Metzner K.J. Challenges and opportunities in estimating viral genetic diversity from next-generation sequencing data. *Front. Microbiol.* **2012**;3: 329-345

Brown DM, Cornell CT, Tran GP, et al. An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* **2005**;79:11962–11973.

Casas I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* **1995**;53:25-36.

Chan J.Z., Pallen M.J., Oppenheim B. and Constantinidou C. Genome sequencing in clinical microbiology. *Nat. Biotechnology* **2012**;30: 1068–1071

Chow M, Newman JF, Filman D, et al. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* **1987**;327:482-486.

Chris Lauber and Alexander E. Gorbalenya. Toward Genetics-Based Virus Taxonomy: Comparative Analysis of a Genetics-Based Classification and the Taxonomy of Picornaviruses. *Journal of Virology* (2012) pp. 3905-3915.

Colston E, Racaniello VR. Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J* 1994;13:5855–5862.

Colston EM, Racaniello VR. Poliovirus variants selected on mutant receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J Virol* 1995;69:4823–4829.

Danthi P, Tosteson M, Li QH, et al. Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus. *J Virol* 2003;77:5266-5274.

De Jesus N.H. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virology* 2007; 4: 70-88.

Dedepsidis E, Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Brakoulis C, Levidiotou-Stefanou S, Pratti A, et al. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/ Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:343 - 351.

Djiken Appolinaire and Spiro David. Advancing full length genome sequencing for human RNA viral pathogens. *Future Virol.* 2009;4(1): 47-53

Duggal R., A. Cuconati, M. Gromeier, and E. Wimmer.. Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:13786-13791.

Dupinay T., Nguyen A., Croze S., Barbet F., Rey C., Mavingui P., Pepin M., Lachuer J. and Legras-Lachuer C. Next-generation sequencing of ultra-low copy samples: From clinical FFPE samples to single-cell sequencing. *Current topics in Virology vol. 10, 2012.*

Echeverri AC, Dasgupta A. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 1995;208:540–553.

Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, et al. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* 2000;74: 6570–6580.

Egger D., Bienz K. Recombination of poliovirus RNA proceeds in replication complexes originating from distinct replication starts. *J. Virol.* 2002;76(21): 10960 – 10971.

Flanegan JB, Petterson RF, Ambros V, et al. Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:961–965.

Fricks CE, Hogle JM. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 1990;64:1934–1945.

G.Palacios and MS Oberste. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *Journal of neurovirology* 2005;11: 424 – 433

Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* **1998**;12:2293–2304.

Glenn T.C. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* **2011**;11: 759-769.

Gmyl A. P., Belousov E. V., Maslova S. V., Khitrina E. V., Chetverin A. B., Agol A. I. Nonreplicative RNA Recombination in Poliovirus. *J. Virol.* **1999**;73(11): 8958 – 8965.

Greber UF. Signaling in viral entry. *Cell Mol Life Sci* **2002**;59(4):608-626.

Harber J, Bernhardt G, Lu H-H, et al. Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology* **1995**;214: 559–570.

Hober D., Sané F., Riedweg K., Moumna I., Goffard A., Choteau L., Alidjinou E. K. and Desaillood R. *Viruses and Type 1 Diabetes: Focus on the Enteroviruses, Type 1 Diabetes, Dr. Alan Escher (Ed.), 2013 ISBN: 978-953-51-1017-0, InTech, DOI: 10.5772/52087.*

Hunt S. L., and Jackson R. J. Polypyrimidine-tract binding protein (PTB) is necessary, but not sufficient, for efficient internal initiation of translation of human rhinovirus-2 RNA. *RNA*. **1999**;5: 344-359.

Jacobson S. J., D. A. Konings, and P. Sarnow. Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol*. **1993**;67:2961-2971.

Kauder S. E. and Racaniello V. R. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* **2004**;113: 1743-53.

Guillot S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert- Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic.. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* **2000**;74(18):8434-8443.

Kew O, De L, Yang C-F, et al. The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res* **1993**;215-246.

Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *MMWR Surveill Summ.* **2006**;55:1–20.

Kirkegaard K., and Baltimore D. The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* **1986**;47(3): 433 – 443

Kiss C., Kost-Alimova M., Klein G., Szekely L., Optimisation of the degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR) for capillary thermocycler. *Biomolecular Engineering* **2002**;19: 31–34

Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* **1981**;291: 547–553.

Knipe D. M., and Howley P. M. (2007) *Fields Virology, 5th Edition Vol:1*, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.

Knowles, N.J., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Zell, R. *Picornaviridae*. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: *King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J.* San Diego: (2012) Elsevier, pp 855-880.

Koike S, Taya C, Kurata T, et al. Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**;88: 951–955.

Kottaridi C., Bolanaki E., Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pratti A., Markoulatos P. Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn.Microbiol. Infect. Dis.* **2007**;58(4): 407 – 412

Kyriakopoulou Z, Dedepsidis E, Pliaka V, Mastorakos P, Stamati A, Pratti A, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. (2010) Molecular identification and full genome analysis of an echovirus 7 strain isolated from the environment in Greece. *Virus Genes*.**2010**;40(2):183-92.

Le Gall O., Christian P., Fauquet C. M., King A. M. Q., Knowles N. J., Nakashima N., Stanway G., Gorbalenya E. E. *Picornavirales*, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo T=3 virion architecture. *Arch. Virol.* **2008**;153(4): 715–727

Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, et al. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **1977**;74:59–63.

Liao S, Racaniello V. Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J Virol* **1997**;71:9770–9777.

Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., Ilonen J. Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* **2003**;77(19): 10423-31.

Lyons T., K. E. Murray, A. W. Roberts, and D. J. Barton. Poliovirus 5'-Terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **2001**;75(22): 10696-10708.

McClenahan S. D., Uhlenhaut C., Krause P. R. Optimization of virus detection in cells using massively parallel sequencing. *Biologicals***2013**;42: 34-41

Marc D, Drugeon G, Haenni AL, et al. Role of myristoylation of poliovirus capsid protein VP4 as determined by site-directed mutagenesis of its N-terminal sequence. *EMBO J* **1989**;8:2661-2668.

Marc D, Girard M, van der Werf S. A Gly1 to Ala substitution in poliovirus capsid protein VP0 blocks its myristoylation and prevents viral assembly. *JGen Virol* **1991**;72:1151-1157.

Marc D, Masson G, Girard M, et al. Lack of myristoylation of poliovirus capsid polypeptide VPO⁺ prevents the formation of virions or results in the assembly of noninfectious virus particles. *J Virol* **1990**;64:4099-4107.

Marston D. A., McElhinney M. I., Ellis R. J., Horton D. L., Wise E. L., Leech S. L., David D.,

Lamballerie X. and Fooks A. Next generation sequencing of viral RNA genomes. *BMC Genomics* **2013**;14: 444-456

Melchers W. J., Zoll J., Tessari M., Bakhmutov D. V., Gmyl A. P., Agol V. I., and Heus H. A. A GCUA tetranucleotide loop found in the poliovirus oriL by in vivo SELEX (un)expectedly forms a YNMG-like structure: Extending the YNMG family with GYYA. *RNA* **2006**;12(9): 1671 – 168.2

Melnick J. L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology, Second Edition (ed. Fields B. N.)* **1990**;549 – 605.

Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al. Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **2003**;77: 5136–5144.

Moscufo N, Yafal AG, Rogove A, et al. A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *J Virol* **1993**;67:5075-5078.

Moscufo N, Chow M. Myristate-protein interactions in poliovirus: interactions of VP4 threonine 28 contribute to the structural conformation of assembly intermediates and the stability of assembled virions. *J Virol* **1992**;66:6849-6857.

Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M. N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G. M., and van Loon A. M. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**;11(1): 202 – 227

Murray K. E., and Barton D. J. Poliovirus CRE – dependent VPg uridylylation is required for positive – strand RNA synthesis but not for negative – strand RNA synthesis. *J. Virol.* **2003**;77(8): 4739–4750.

Nomoto A., Detjen B. M., Pozzatti R., Wimmer E. Location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* **1977**;268(5617): 208–213

Novak JE, Kirkegaard K. Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* **1991**;65:3384–3387.

Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Flemister M. R., Brown B. A., and Pallansch M. A. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* **1999**;37:1288-93.

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol.* **1999**;73(3):1941-1948

Oberste MS, Maher K, Kennett ML, Campbell JJ, Carpenter MS, Schnurr D, Pallansch MA. (1999) Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol.* **1999**;37(12):3928-3933

Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, Peñaranda S, Mishrik N, Uddin M, Pallansch MA. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen*

Virol. **2006**;87(Pt 1):119-28.

Ochs K., Saleh L., Basssili, G., Sonntag V., Zeller A., and Niepmann M. Interaction of translation factor eIF4B with poliovirus internal ribosome entry site. *J. Virol.* **2002**;76:2113 – 2122.

Pallansch M, Roos R. In: *Fields virology*. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, editor. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott, Williams & Wilkins; (2007). Enteroviruses, polioviruses, echoviruses, and newer enteroviruses.

Paximadi E, Karakasiliotis I, Mamuris Z, Stathopoulos C, Krikelis V, Markoulatos P. Genomic analysis of recombinant Sabin clinical isolates. *Virus Genes* **2006**;32:203-210.

Paximadi E, Karakasiliotis I, Papaventsis D, Papageorgiou G, Markoulatos P. Recombinant Sabin environmental isolates in Greece and Cyprus. *J Appl Microbiol* **2008**;104:1153-1162

Pelkmans L, BřOrli T, Zerial M, et al. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* **2004**;118(6):767-780.

Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D. Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol* **1978**;27: 357–365.

Pilipenko E. V., Gmyl A. P., Agol V. I. A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc. Ac. Res.* **1995**;23(11): 1870–1875.

Pliaka V, Dedepsidis E, Kyriakopoulou Z, Mpirli K, Tsakogiannis D, Pratti A, et al. A new RT-PCR assay for the identification of the predominant recombination types in 2C and 3D genomic regions of vaccine-derived poliovirus strains. *Mol Cell Probes* **2010**;24:115-123.

Prevot D., Decimo D., Herbreteau C. H., Roux F., Garin J., Luc Darlix J., and Ohlmann T. Characterization of a novel RNA – binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Jour.* **2003**;22:1909-1921.

Racaniello VR, Baltimore D. Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**;78:4887–4891.

Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* **1981**;214:916–919.

Racaniello R. Vincent (2007). Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology, 5th ed.* Lippincott Williams and Wilkins **2007**;796-838.

Rieder E, Paul AV, Kim DW, et al. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* **2000**;74: 10371–10380.

Rivera V, Welsh J, Maizel JJ. Comparative sequence analysis of the 5'UTR-noncoding region of the enteroviruses and rhinoviruses. *Virology* **1988**;165:42-50.

Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Victorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E.

A., Agol V. I. The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*.**1986**;155: 202–213.

Rossmann M. G., He Y., Kuhn R. J. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.***2002**;10(7): 324–331.

Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM. The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1969**;62: 912–919.

Sanfacon H., Gorbalenya A. E., Knowles N. J., and Chen Y. Picornavirales. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International 81 Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., and Lefkowitz E. J. San Diego, *Elsevier*:**2011**; 835–839.

Semler, B. L., and Ertel, K. J. Picornaviridae: molecular biology In: *B. Mahy and M. Van Regenmortel, eds. Encyclopedia of Virology, 3rd edition, vol. 4. Elsevier Ltd., Oxford, U.K. 2008, pp. 129-140.*

Sharma R., Raychaudhuri S., and Dasgupta A. Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology* **2004**;320:195–205.

Sibley C. D., Peirano G., Church D. L. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: Current and potential application in diagnostic microbiology *Infect. Genet. Evol.***2012**;12: 505-521

Skinner MA, Racaniello VR, Dunn G, et al. A new model for the secondary structure of the 5'UTR noncoding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data which also show that RNA secondary structure is important to neurovirulence. *J Mol Biol***1989**;207:379-392.

Spector DH, Baltimore D. Requirement of 3'-terminal poly(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA***1974**;71:2983–2987.

Stanway G. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.***1990**;71(11): 2483-2501

Stanway G., Hughes P. J., Mountford R. C., Minor P. D. and Almond J. W. The complete nucleotide sequence of a common cold virus; human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res.* **1984**;12:7859-7875.

Summers DF, Maizel JV. Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1968**;59:966–971.

Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, et al. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* **2005**;170(5):769-779.

Telenius H., Carter P. N., Bebb C. E., Nordenskjold M., Ponder B. A. J. and Tunnacliffe A. Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: General Amplification of Target DNA by a Single Degenerate Primer. *Genomics***1992**;13: 718 – 725

Todd S, Towner JS, Brown DM, et al. Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol.* **1997**;71:8868–8874.

Tosteson MT, Chow M. Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. *J Virol.* **1997**;71:507-511.

Wickman I. Beiträge zur Kenntnis der Heine-Medinschen Krankheit (Poliomyelitis acuta und verwandter Erkrankungen). *Berlin: Karger*; **1907**.

Wimmer E, Hellen CUT, Cao X. Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet* **1993**;27:353-436.

Yogo Y, Teng MH, Wimmer E. Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun* **1974**;61:1101–1109.

Yogo Y, Wimmer E. Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **1972**;69:1877–1882.